

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Практикум по БИОХИМИИ

Под редакцией
С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой

Второе издание, переработанное и дополненное

Допущено Государственным комитетом СССР по народному образованию в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей университетов

Издательство
Московского университета
1989

ББК 28.902

П69

УДК 577.15

Рецензент:

кафедра биохимии Ленинградского государственного университета
(зав. кафедрой профессор С. Н. Лызлова)

**П69 Практикум по биохимии: Учеб. пособие/Под ред. С. Е. Се-
верина, Г. А. Соловьевой. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.:
Изд-во МГУ, 1989. — 509 с.: ил.
ISBN 5—211—00406—X.**

В пособии (1-е изд. — 1979 г.) рассматриваются современные методы аналитической биохимии, основы препаративной энзимологии, методы изучения кинетики и механизмов регуляции ферментативных процессов, приемы иммобилизации ферментов и иммуноферментного анализа, а также методы, используемые при изучении метаболизма митохондрий и биоэнергетики.

Для студентов биологических специальностей университетов.

П 1910000000 (4309000000)—126 144—89
077(02)—89

ББК 28.902

ISBN 5—211—00406—X

© Издательство Московского

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящее учебное пособие ставит своей целью ознакомление с важнейшими принципами и методами экспериментальной биохимии. Оно составлено коллективом кафедры биохимии биологического факультета МГУ на основе многолетней работы со студентами III и IV курсов, специализирующимися по биохимии. Организаторами практикума по биохимии в 1939 г. были С. Е. Северин, А. В. Голубцова и Н. П. Мешкова. Позднее практикум был полностью реорганизован Н. П. Мешковой; задачи были систематизированы, приобрели плановый характер; была обеспечена безукоризненная воспроизводимость всех описанных работ. Для разработки программы практикума много сделали Е. А. Мишукова и И. М. Бочарникова. Целый ряд задач введен по предложению Н. В. Алексахиной и Е. И. Королевой. Непрерывному совершенствованию практикума уделяет большое внимание академик С. Е. Северин.

В 1950 г. был издан «Практикум по биохимии животных», в 1979 г. — «Практикум по биохимии» под общей редакцией профессора Н. П. Мешковой и академика С. Е. Северина. Настоящий «Практикум по биохимии» под редакцией С. Е. Северина и Г. А. Соловьевой представляет собой новое учебное пособие, написанное с учетом современных методов исследования. Он состоит из шести разделов:

1. Углеводы и липиды.
2. Природные азотсодержащие соединения.
3. Энзимология.
4. Иммуноферментный анализ.
5. Регуляция активности ферментов.
6. Биохимия митохондрий. Биоэнергетика.

В каждом разделе студенты самостоятельно выполняют работу, представляющую собой небольшое экспериментальное исследование, результаты которого оформляются в виде отчета. На семинарах, которые проводятся параллельно практической работе, разбираются теоретические вопросы и обсуждаются полученные студентами результаты.

С первых дней практикума особое внимание обращается на приобретение студентами навыков самостоятельной работы в химической лаборатории: умению рассчитать концентрации необходимых растворов, приготовить их и проверить правильность приготовления, а также освоению необходимых методов исследования. Опыт лабораторной работы, приобретенный на первых разделах практикума, дает возможность успешно выполнять задания последующих разделов, требующих больших экспериментальных навыков. Все работы, включенные в «Практикум по биохимии», многократно воспроизведены при проработке большого практикума студентами кафедры. Это дает возможность сопоставлять полученные результаты с теоретически ожидаемыми, оценивать тщательность работы студентов и уровень их подготовки.

Постепенное, от раздела к разделу, систематическое усвоение программы практикума, а также лекционных курсов и семинарских

занятий обеспечивает фундаментальную теоретическую и практическую подготовку студентов, позволяющую им впоследствии самостоятельно работать в биохимических лабораториях самого различного профиля.

В разработке ряда задач принимали участие сотрудники кафедры Л. В. Белоусова, И. Д. Бобрускин, С. П. Петухов, А. В. Скурат, за что коллектив авторов выражает им глубокую благодарность.

Коллектив авторов весьма признателен академику АМН СССР И. П. Ашмарину за критические замечания и ценные советы.

Все замечания и пожелания будут приняты авторами с благодарностью.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	— аденозиндифосфат
АМФ	— аденозинмонофосфат
цАМФ	— циклический аденозинмонофосфат
АТФ	— аденозинтрифосфат
ДНФБ	— 2,4-динитрофторбензол
ДСН	— додецилсульфат натрия
ДТНБ	— 5,5'-дитиобис (2-нитробензоат)
ДЭАЭ	— диэтиламиноэтил
КМ	— карбоксиметил
КоА	— коэнзим А
НА	— никотинамид
НАД ⁺	— никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАДН	— никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ ⁺	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный
ПХМБ	— пара-хлормеркурибензоат
РНК	— рибонуклеиновая кислота
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ФАД	— флавинадениндинуклеотид окисленный
ФАДН	— флавинадениндинуклеотид восстановленный
ФМН	— флавинаденинмононуклеотид
ЭГТА	— этиленгликольтетраацетат
ЭДТА	— этилендиаминтетраацетат
BES	— HN — бис (2-гидроксиэтил) -2-аминоэтансульфо-кислота
MES	— 2(N-морфолино)этансульфо-кислота
MOPS	— 3-(N-морфолино)пропансульфо-кислота
PIPES	— пиперазин-N, N'-бис-2-этансульфо-кислота
HEPES	— N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфо-кислота
ТЕМЕД	— N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин

Раздел первый

УГЛЕВОДЫ И ЛИПИДЫ

Экспериментальные приемы, применяемые в биохимии для изучения метаболизма, разнообразны. Исследования химических превращений проводятся на уровне целых органов, в тонких срезах и клеточных культурах, в гомогенатах тканей, органелл и очищенных ферментов. В любом эксперименте важную роль играют методы количественной регистрации химических превращений. Гравиметрические методы недостаточно чувствительны и часто непригодны для анализа органических соединений. Поэтому в биохимии широко применяются спектрофотометрические и колориметрические методы, имеющие высокую чувствительность и позволяющие определять очень небольшие количества веществ. Некоторые превращения сопровождаются поглощением или выделением газа. Для количественной регистрации таких превращений применяются манометрические методы.

Первый раздел «Практикума» должен помочь студентам освоить методические приемы и основы аналитической биохимии. Он содержит описание основных принципов и методов концентрационного анализа, принятых в биохимии (спектрофотометрического, колориметрического, манометрического), в частности, для количественного определения гликогена, глюкозы, неорганического фосфата, фосфорных эфиров углеводов, молочной и пировиноградной кислот. В раздел включены работы, посвященные анаэробному превращению углеводов. Каждая задача, выполняемая студентом, предусматривает анализ чистоты исходного препарата углевода или его фосфорного эфира, получение ферментного препарата (гомогената или экстракта ткани), постановку биохимического эксперимента, количественную оценку результатов. Количественное определение веществ проводится несколькими методами, результаты сопоставляются. Так, выполняя задание по теме «Превращение фруктозо-1,6-дифосфата в молочную кислоту», студент анализирует фруктозо-1,6-дифосфат по фруктозе и по фосфату, молочную кислоту определяет спектрофотометрическим и колориметрическим методами. Подобным образом выполняются работы, связанные с превращением других фосфорных эфиров углеводов, гликогена, глюкозы.

В раздел включены также задачи, знакомящие с методами выделения липидов из биологического материала, фракционированием их с помощью колоночной и тонкослойной хроматографии, с методами количественного определения.

1. МЕТОДЫ КОНЦЕНТРАЦИОННОГО АНАЛИЗА

1. ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ (СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ И КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ) МЕТОДЫ

Фотометрические методы основаны на общем законе светопоглощения Бугера—Ламберта—Бера, который определяет соотношение

между интенсивностью падающего (I_0) и прошедшего через поглощающий раствор (I) монохроматического излучения:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon Cl.$$

Величина $\lg I_0/I$ характеризует степень ослабления интенсивности излучения после пропускания через раствор. Ее называют оптической плотностью раствора, или его экстинкцией, и обозначают буквой A (иногда D или E). Закон отражает линейную зависимость A от концентрации поглощающего вещества C , толщины поглощающего слоя l , коэффициента поглощения (коэффициента экстинкции) ϵ . При концентрации раствора 1 М и толщине поглощающего слоя 1 см ϵ представляет собой коэффициент молярного поглощения. Он является основной характеристикой, отражающей способность вещества поглощать свет в определенном растворителе и при определенной длине волны. Чем больше величина ϵ , тем выше чувствительность спектрофотометрического метода определения вещества. Иногда пользуются коэффициентом удельного поглощения $A^{1\%}_{1\text{см}}$, представляющим собой величину оптической плотности 1%-ного (масса/объем) раствора при длине пути света 1 см.

Величина оптической плотности A изменяется от 0 до ∞ . Однако на практике достаточная точность ее измерения возможна в интервале значений от 0,2 до 0,8. Градуировка шкал фотометрических приборов обычно осуществляется как в величинах A , так и в величинах T .

T — отношение интенсивности излучения, прошедшего через поглощающий раствор, к интенсивности первоначального излучения. Это отношение называется пропусканием.

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon Cl}.$$

Величина T , отнесенная к толщине поглощающего слоя в 1 см, называется коэффициентом пропускания.

Оптическая плотность A и пропускание T связаны уравнением: $A = -\lg T$. Пропускание обычно измеряется в процентах и меняется от 0 до 100%. Если T выражено в процентах, то $A = 2 - \lg T\%$.

При определении концентрации вещества на спектрофотометрах обычно снимают отчеты по шкале оптических плотностей. Можно пользоваться шкалой процента пропускания, а затем пересчитывать полученные данные в единицах A . Концентрацию исследуемого вещества определяют по величине оптической плотности при известных ϵ и l :

$$C = \frac{A}{\epsilon l}.$$

В качестве «нулевого» раствора используют растворитель или раствор, содержащий все компоненты, кроме исследуемого вещества.

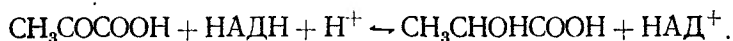
Спектрофотометрия основана на измерении поглощения монохроматических излучений. Современные спектрофотометры (призменные приборы или приборы с дифракционными решетками) дают высокомонохроматизированный поток излучения. Они применяются для концентрационного анализа и при изучении спектров поглощения веществ.

Растворы для исследования должны быть прозрачными, без пузырьков воздуха, способствующих увеличению рассеивания света. Нельзя исследовать холодные растворы, так как на стенках кювет могут конденсироваться пары воды. Кюветы нужно заполнять до тако-

го уровня, чтобы поток излучения проходил целиком через слой раствора. В кюветное отделение их устанавливают в строго определенном порядке. Кюветы требуют специального ухода. Капли, царапины и грязь на их стенках сильно рассеивают и поглощают свет, что приводит к искажению результатов. Кюветы следует тщательно мыть дистиллированной водой, перед употреблением просушивать. Касаться руками их оптических стенок нельзя. Кюветы очень хрупкие, особенно кварцевые, которые используют при работе в ультрафиолетовой области спектра, поэтому с ними надо обращаться осторожно, не допускать механических повреждений.

Широкое распространение получили спектрофотометрические методы количественного определения веществ, имеющих характерные максимумы поглощения: белков (с. 83), нуклеиновых кислот (с. 162), нуклеотидов (с. 180).

Для некоторых биологических молекул разработаны энзиматические методы количественного определения. Они основаны на том, что под влиянием специфического действия фермента на определяемое вещество образуется эквимолекулярное количество продукта реакции, обладающего характерным спектром поглощения. Так, пировиноградную или молочную кислоту можно количественно определить с использованием лактатдегидрогеназы (с. 31).



Спектры поглощения восстановленной и окисленной форм пиридиновых нуклеотидов существенно отличаются: спектр поглощения НАД⁺ имеет максимум при длине волны 260 нм, спектр поглощения НАДН — при 340 нм. Таким образом, метод сводится к количественному определению убыли или прироста восстановленного никотинамидадениндинуклеотида. Для этого регистрируют изменение оптической плотности реакционной смеси при 340 нм. Коэффициент молярного поглощения НАДН (НАДФН) при 340 нм равен $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. При расчетах исходят из того, что при окислении—восстановлении 1 мкмоль кофермента при 340 нм в кювете с расстоянием между рабочими гранями 1 см в 1 мл реакционной смеси оптическая плотность меняется на 6,22 ед. Количество определяемого вещества в пробе (в микромолях) рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{\Delta A_{340} V}{6,22},$$

где ΔA_{340} — изменение оптической плотности реакционной смеси; V — объем пробы (мл), в которой протекает реакция. Спектрофотометрическое определение НАДН и НАДФН используется при определении активности многих ферментов (с. 208). Иногда при высоких концентрациях НАДН в кювете целесообразно проводить определение, снижая чувствительность метода, т. е. не в максимуме поглощения восстановленного нуклеотида. Так, при 366 нм коэффициент молярного поглощения НАДН уменьшается почти вдвое и становится равным $3,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Наряду со спектрофотометрическими методами в концентрационном анализе широко применяются **колориметрические методы**. Многие соединения, обладающие незначительным поглощением, после реакции с другими веществами дают окрашенные продукты, количество которых пропорционально количеству исходного вещества. В биохимии такие цветные реакции используют для обнаружения вещества в

растворе и определения его концентрации. Широкое распространение получили колориметрические методы количественного определения неорганического фосфата и фосфорсодержащих соединений (с. 33), гликогена, глюкозы (с. 23), фруктозы (с. 41), белка (с. 80). Для работы обычно используют упрощенные спектрофотометры или фотоэлектроколориметры (ФЭК). Современный ФЭК представляет собой оптический прибор, в котором монохроматизация потока излучения осуществляется с помощью светофильтров. Каждый светофильтр характеризуется длиной волны максимума и полушириной пропускания.

Колориметрический анализ проводят сравнением поглощения исследуемого раствора с поглощением проб стандартного ряда. Пробы стандартного ряда с возрастающим содержанием анализируемого вещества готовят из раствора точной концентрации. При этом учитывают границы чувствительности данного конкретного метода. «Нулевая проба» должна содержать все компоненты, за исключением анализируемого вещества. Необходимо помнить, что интенсивность окраски определяется концентрацией вещества, но зависит также от температуры и времени развития окраски. Поэтому опытные и стандартные пробы должны быть обработаны в строго определенных одинаковых условиях.

При колориметрировании рекомендуется соблюдать следующую очередность в работе: 1) выбрать светофильтр; 2) выбрать кюветы; 3) определить оптическую плотность проб стандартного ряда, построить калибровочный график; 4) определить оптическую плотность исследуемых проб, произвести расчет концентрации анализируемого вещества.

Цветную реакцию обычно исследуют в максимуме поглощения. Если спектральные характеристики окрашенного вещества неизвестны и указания в методике отсутствуют, светофильтр для работы можно выбрать самостоятельно. В видимой части спектра воспринимаемый цвет есть результат избирательного поглощения определенного участка спектра белого света. Цвет раствора является дополнительным к цвету поглощенного излучения. Поэтому измерение поглощения следует проводить в дополнительной для цветной реакции области спектра. Так, если раствор окрашен в сине-зеленый цвет, то нужно измерять поглощение этим раствором красного цвета (табл. 1).

Таблица 1*

Наблюдаемые цвета и соответствующие им поглощенные участки спектра

Интервал длин волн поглощенного излучения, нм	Цвет поглощенного излучения	Наблюдаемый цвет
400—450	фиолетовый	желто-зеленый
450—480	синий	желтый
400—550	сине-зеленый	оранжевый
500—560	зеленый	красно-пурпурный
400—610	сине-зелено-желтый	красный
450—650	зелено-желто-красный	пурпурный
625—750	красный	сине-зеленый

Для более точного выбора светофильтра окрашенный раствор наливают в кювету и определяют величину его оптической плотности на ФЭКе со всеми имеющимися светофильтрами. По полученным данным строят график, откладывая по оси абсцисс длины волн максиму-

мов пропускания светофильтров, а по оси ординат — соответствующие значения A раствора. Отмечают участок графика, приблизительно параллельный горизонтальной оси и характеризующийся значительной величиной оптической плотности. Максимум пропускания выбранного для работы светофильтра должен соответствовать отмеченному участку на графике.

Приступая к работе, необходимо из набора, который прилагается к каждому ФЭКу, выбрать кюветы оптимального размера. Так как согласно уравнению $A = \epsilon Cl$, оптическая плотность зависит от толщины поглощающего слоя, выбор кювет должен быть сделан с таким расчетом, чтобы значения оптических плотностей для проб стандартного ряда укладывались в интервале 0,1—1,0. Для получения точных результатов лучше работать в более узком интервале: от 0,1 до 0,6 единиц оптической плотности. Выбор кювет проводят следующим образом: определяют оптическую плотность одной пробы стандартного ряда со средним содержанием анализируемого вещества, пользуясь кюветами с расстоянием между рабочими гранями, равным 1 см. Если значение оптической плотности составляет приблизительно 0,3—0,35, то данную кювету используют для работы, если больше или меньше этого интервала, берут кювету меньшего или большего размера. Остальные требования к кюветам такие же, как при спектрофотометрическом анализе.

Результаты колориметрирования проб стандартного ряда оформляют в виде графика зависимости интенсивности окраски от количества анализируемого вещества. По оси ординат откладывают значения оптической плотности по показанию ФЭКа, а по оси абсцисс — содержание вещества в соответствующей пробе. Калибровочный график должен иметь вид прямой, выходящей из начала координат. Экстраполировать полученную прямую к значениям оптических плотностей, лежащим выше последней экспериментально полученной точки, не следует. Обычно для получения калибровочного графика достаточно пяти проб стандартного ряда, чтобы получить пять равномерно расположенных точек в интервале чувствительности конкретного метода. При воспроизведении графика можно воспользоваться несколькими пробами с количествами вещества, близкими к среднему.

Следует заметить, что калибровочные графики, построенные с реактивами разных партий, как правило, не совпадают. Поэтому при смене реактивов график необходимо построить заново. График, полученный при работе на одном ФЭКе, недопустимо использовать для расчета результатов колориметрирования, проведенного на другом приборе. Особенности приборов, главным образом различия в монохроматизации света, влияют на чувствительность фотометрических определений. При монохроматическом излучении тангенс угла наклона зависимости $A = f(C)$ имеет большую величину, чем тогда, когда поток света состоит из нескольких излучений различных длин волн, из которых только часть поглощается исследуемым раствором.

После измерения оптической плотности в опытных пробах проводят расчеты, пользуясь калибровочным графиком. Если оптическая плотность пробы выходит за его пределы, необходимо заново приготовить раствор с таким количеством вещества, чтобы попасть на калибровочную прямую. Разбавлять реакционную смесь перед колориметрированием не следует: это может привести к неверным результатам. По графику определяют содержание анализируемого вещества и, учитывая объем исследуемого раствора, рассчитывают его количество в 1 мл сначала для каждой пробы, а затем находят среднее значение.

2. МАНОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ВАРБУРГА

Манометрический метод, разработанный О. Варбургом в 20-х годах для определения дыхания переживающих тканей, может быть использован и для исследования других обменных процессов, например гликолиза, дезаминирования, изучения ферментов и субстратов промежуточного обмена веществ. Метод позволяет определять изменение давления в замкнутой системе за счет выделения или поглощения в процессе реакции газообразного продукта. Этим замкнутым пространством служат сосудики разнообразной формы, присоединенные посредством шлифа к манометру, заполненному специальной, не смачивающей стенки манометра жидкостью. Зная объем замкнутого пространства V и измерив наступившее в результате реакции изменение давления h , можно рассчитать объем образовавшегося или поглощенного газообразного продукта. Измерения производят в аппарате Варбурга.

Описание аппарата Варбурга

Аппарат состоит из специального манометрического устройства — сосудиков, соединенных с манометрами (рис. 1), и водяного термостата с чувствительной терморегуляцией (до $0,05^{\circ}\text{C}$), в который погружены сосудики. На внешней стороне термостата имеются специальные крепления для манометров. Термостат снабжен механическим устройством, обеспечивающим равномерное покачивание погруженных в термостат сосудиков. Это обеспечивает равновесие между газовой фазой и инкубируемым раствором.

Манометры и сосудики.

Манометры с пришлифованными к ним сосудиками — основная часть аппарата Варбурга. Манометры делаются из толстостенных стеклянных трубок, внутренний диаметр которых обычно равен 1 мм. Некоторые колебания размеров диаметра допустимы, однако нежелательно, чтобы они выходили за пределы от 0,8 до 1,2 мм. Манометр в целом (см. рис. 1) имеет U-образную форму, причем одна из его ветвей (левая) заканчивается небольшим расширением (открытой воронкой); другая имеет боковой отросток, выше которого расположен обычный двух-

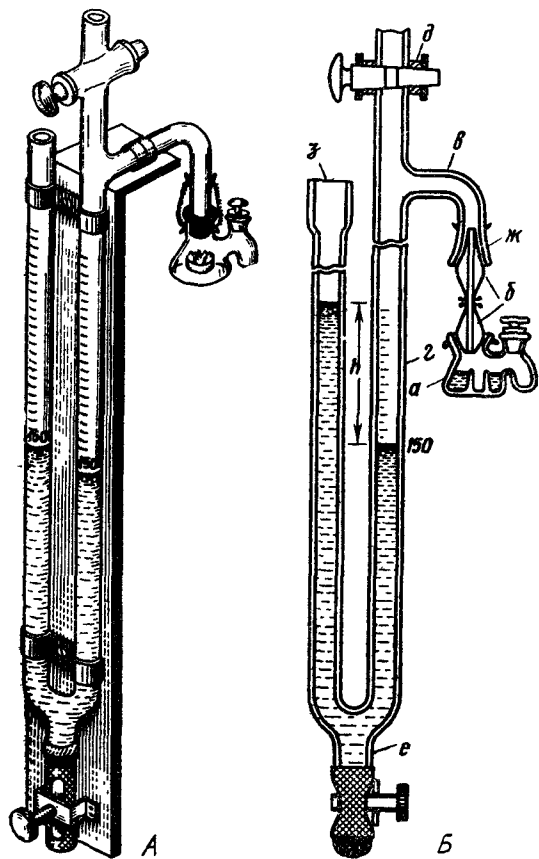


Рис. 1. Манометр к аппарату Варбурга.
А — общий вид; Б — схема

ходовой кран. Боковой отросток заканчивается длинным (около 3 см) конусообразным, слегка расширяющимся книзу шлифом, к которому через вставку притерт сосудик. Внизу обе ветви манометра сливаются в один короткий (длиной 1,5—2 см) отросток, на который надевается резиновая трубка, наполненная манометрической жидкостью. Свободный конец резиновой трубки заперт оплавленной стеклянной палочкой. В качестве манометрической жидкости используют следующие растворы:

1) 25 г NaCl, 5 г холевокислого натрия растворяют в 500 мл воды. Жидкость подкрашивают флуоресцеином или кислым фуксином. Удельный вес — 1,033;

2) 11,5 г NaCl растворяют в воде, добавляют 25 мл 20%-ного водного раствора ОП—10 (синтетический детергент, выпускаемый отечественной промышленностью), подщелачивают 1—3 каплями 10%-ного раствора КОН, добавляют флуоресцеин или бромкрезоловый пурпурный и доводят объем раствора водой до 250 мл. Удельный вес — 1,033.

Рекомендуется между шлифом на конце бокового отростка и сосудиком иметь вставку, представляющую собой короткую (5—7 см) трубку, верхняя часть которой притерта в виде длинного конуса к шлифу манометра, а нижняя — к шлифу сосудика. Притертая поверхность в виде длинного конуса позволяет иметь к одному и тому же манометру несколько (две-три) хорошо притертых вставок, нижняя часть которых, в свою очередь, притерта к различным сосудикам.

Вставка и притертый к ней сосудик хранятся вместе. В любой момент они могут быть использованы для работы с тем манометром, к которому пришлифована вставка.

Форма и величина сосудиков (рис. 2) могут быть самыми различными в зависимости от цели эксперимента. Часто при определении



Рис. 2. Сосудики к манометру аппарата Варбурга.

Вверху — разные типы сосудиков; внизу — сосудик с двумя вращающимися ретортами

одного лишь поглощения кислорода применяются маленькие сосудики объемом в 4—6 см³ с небольшим дополнительным резервуаром для раствора щелочи, поглощающей углекислый газ (рис. 2, № 1).

Когда предполагается образование не только углекислого газа, но и аммиака, пользуются сосудиками с впаянным дополнительным цилиндром, куда помещается кислота, поглощающая аммиак (рис. 2, № 2).

Иногда в эксперименте во время инкубации необходимо добавлять в опытную смесь реактивы. В этих случаях пользуются сосудиками с пришлифованными и вращающимися на шлифе реторточками (рис. 2, № 3, 4). Весьма удобными и наиболее универсальными являются сосудики с двумя пришлифованными реторточками и внутренним кольцевым желобом для щелочи, поглощающей CO_2 (рис. 2). Сосудики этой формы широко применяются для одновременного определения поглощенного O_2 и образовавшегося во время работы CO_2 .

Определение константы сосудиков. До начала измерений следует установить величину констант сосудиков K . Физический смысл константы можно характеризовать объемом газа (приведенного к нормальным условиям), который должен выделиться или поглотиться в системе, чтобы вызвать смещение жидкости в манометре на 1 мм. Величина константы зависит от объема сосудика и прилегающей к нему части манометра, объема помещаемой в сосудик реакционной смеси, от природы выделяющегося или поглощаемого газа (CO_2 , O_2 и др.) и температуры термостата во время опыта. Чтобы определить количество газа, образовавшегося или поглощенного во время опыта в данный отрезок времени, и выразить это количество в кубических миллиметрах, величину K умножают на разность между начальным и конечным давлением в системе, выраженной в миллиметрах столба манометрической жидкости. Из сказанного следует, что размерность константы выражается в квадратных единицах, например в мм^2 .

Точность полученных на аппарате Варбурга результатов зависит от того, насколько тщательно определена величина константы. Имея это в виду, следует несколько раз повторить определение константы каждого сосудика и лишь при хорошем совпадении результатов взять среднюю величину. Как уже было сказано, величина константы определяется объемом газового пространства, в котором протекает реакция. Этот объем зависит от объема сосудика с прилегающими частями манометра до уровня манометрической жидкости (назовем его V) и от объема используемой в опыте реакционной смеси (V_1). Объем газового пространства во время опыта будет равен $V - V_1$. Так как объем опытной жидкости и используемых реактивов, помещаемых в сосудик, экспериментатору известен, то для выяснения величины $V - V_1$ прежде всего необходимо определить объем сосудика с прилегающей к нему частью манометра вплоть до уровня манометрической жидкости, т. е. V . Каждое колено U-образной манометрической трубки имеет 300 делений. В правом колене, сообщаемом с помощью изогнутой под прямым углом отводной трубки («коленчатого отростка») с сосудиком, удобно при всех отсчетах устанавливать жидкость на делении 150. В таком случае под объемом сосудика с прилегающей частью манометра, т. е. под объемом V , понимается сумма объемов сосудика *a*, вставки *b*, коленчатой капиллярной трубки *в*, соединяющей сосудик с манометром, и манометрической трубки *г*, идущей от крана *д* до манометрической жидкости, заполняющей капиллярную трубку манометра и установленной на делении 150.

Монтаж манометров и заполнение их манометрической жидкостью. Чистый и сухой манометр укрепляют на подставке — специальной доске, на поверхности которой, обращенной к манометру, имеется зеркало, а наверху — металлическая пластинка, дающая опору коленчатому отростку манометра. Между металлическими перемычками, фиксирующими манометр на подставке, и стеклом манометра должны быть проложены резиновые прокладки.

Один конец хорошо прокипяченной и высушенной эластичной резиновой трубки длиной 10—15 см и подходящего к манометру диаметра закрывают оплавленной стеклянной палочкой и осторожно через открытый конец заполняют доверху манометрической жидкостью. Необходимо следить за тем, чтобы в трубке не оставалось пузырьков воздуха. Трубку с жидкостью надевают на нижний отросток манометра *е*. Значительная часть ее должна находиться под винтовым зажимом, давящая поверхность которого отстоит примерно на 0,5 см как от нижнего отростка манометра, так и от стеклянной палочки, запирающей резиновую трубку снизу.

Медленными движениями винтового зажима поднимают жидкость в обоих коленах манометра и очень медленно ее опускают. Уровень жидкости должен подниматься до деления 300 и опускаться до нуля. Если жидкость не поднимается до верхнего деления или останавливается выше нулевого деления, это значит, что ее либо слишком мало, либо слишком много. В таких случаях количество жидкости надо соответственно увеличить или уменьшить. Это делается следующим образом: закрывают пробкой отверстие шлифа *ж* на коленчатом отростке манометра (см. рис. 1) и при открытом кране опускают жидкость почти до нуля. Затем закрывают кран *д* манометра и, осторожно сдавливая резиновую трубку винтовым зажимом, поднимают жидкость в левом колене манометра до тех пор, пока она не появится в воронкообразном его расширении *з*. После этого жидкость или добавляют, или отбирают ее излишки через воронку *з* (см. рис. 1). Открыв кран манометра, снова проверяют правильность заполнения прибора.

Если в манометрическую жидкость попадают пузырьки воздуха, их удаляют: переводят жидкость вместе с пузырьками воздуха в левое колено манометра (см. выше) и собирающуюся сверху пену осторожно отсасывают свернутой в трубочку фильтровальной бумагой. Так поступают несколько раз до полного удаления пузырьков воздуха. После этого медленными поворотами винтового зажима опускают манометрическую жидкость, открывают кран и снова поднимают ее в обоих коленах манометра до деления 150.

Определение объема газового пространства манометрическим методом

Одним из наиболее надежных методов определения газового пространства является манометрический метод. Принцип этого метода заключается в том, что определяют добавочные давления h_1 и h_2 при введении некоторого одинакового количества газа в систему: в одном случае при пустом сосудике (h_1), в другом — при частичном заполнении сосудика определенным количеством воды (h_2). Если объем сосудика больше 20 см³, то h_2 удобно определять при почти нацело заполненном сосудике, а h_1 — при заполненном приблизительно наполовину. В этом случае следует тщательно определить объем отобранной и оставшейся в сосудике воды. Все определения должны быть проведены при постоянной, например комнатной, температуре термостата.

Теоретические основы определения объема газового пространства манометрическим методом сводятся к следующему.

Если объем газа в газовом пространстве при атмосферном давлении P равен $V+x$, то при сжатии этого объема до величины V (т. е. при уменьшении объема на величину x) давление в замкнутой системе повысится до $(P+h_1)$.

Согласно закону Бойля

$$(V+x)P=V(P+h_1).$$

Если теперь уменьшить объем газового пространства введением в сосудик некоторого объема воды, равного a , т. е. превратить первоначальный объем системы при давлении P в $(V+x-a)$, то сжатие на ту же величину x приведет к большему увеличению давления, чем в первом случае, т. е. давление повысится до $(P+h_2)$, причем $h_2 > h_1$. Теперь согласно закону Бойля

$$P(V+x-a) = (P+h_2)(V-a).$$

Решаем уравнения: $P(V+x) = (P+h_1)V$;

$$P(V+x-a) = (P+h_2)(V-a). \quad PV+Px = PV+h_1V \quad (1)$$

$$\text{и, следовательно, } Px = h_1V. \quad (2)$$

$$PV+Px-Pa = PV+h_2V-Pa-h_2a \quad (3)$$

$$\text{и, следовательно, } Px = h_2V - h_2a. \quad (4)$$

Из (2) и (4) следует

$$h_1V = h_2V - h_2a, \quad (5)$$

или

$$V(h_2 - h_1) = h_2a. \quad (6)$$

Следовательно,

$$V = \frac{h_2a}{h_2 - h_1}. \quad (7)$$

Зная объем воды a , введенной в сосудик или отобранной из него (если вначале определяют h_2), и экспериментально определив h_1 и h_2 , можно вычислить объем газового пространства. Удобнее начинать с определения h_2 .

Определение h_2 . Чистый и сухой сосудик заполняют дистиллированной водой комнатной температуры с таким расчетом, чтобы вода примерно на 0,5 см не доходила до края его притертой поверхности. Точный объем внесенной в сосудик воды записывают. При этом необходимо внимательно следить за тем, чтобы в сосудике не оставалось по стенкам пузырьков воздуха. На шлиф манометра наносят тонкий слой специальной смазки (вазелин с каучуком или ланолин), сосудик притирают к шлифу манометра и укрепляют резиновыми колечками. Поверхности шлифов должны быть прозрачными и не иметь полос в слое смазки. Оставляя краны открытыми, манометры укрепляют в соответствующих «гнездах» на боковой стенке термостата. Сосудики должны быть полностью погружены в воду. Определение проводят при комнатной температуре.

Через 10 мин после погружения сосудика в воду (время, необходимое для выравнивания температуры в сосудиках) поворотами винтового зажима устанавливают манометрическую жидкость на произвольном делении, например 50. **Закрывают краны манометров** и после этого поднимают уровень жидкости в обоих коленах. В левом, открытом колене жидкость поднимается выше; в правом, соединенном замкнутым пространством с сосудиком, частично заполненным водой, — ниже. Доводят уровень жидкости в правом колене манометра до 150 и записывают показание манометра в левом колене, например 280. Краны манометров открывают, опускают жидкость ниже деления 50 и через 5 мин повторяют ту же операцию, т. е. при открытых

кранах уровень жидкости в манометрах снова подводят к делению 50, закрывают краны, доводят уровень жидкости в правом колене до 150 и определяют уровень жидкости в левом колене. Измерения проводят несколько раз, тщательно следя за тем, чтобы жидкость в начале определения стояла на делении 50, а после поднятия останавливалась бы справа на делении 150¹. Если при повторных определениях данные совпадают, т. е. показания левого колена манометра колеблются в очень небольших пределах, переходят к определению h_1 . Если же результаты отдельных измерений резко отличаются, то это говорит либо о негерметичности, либо о неаккуратном проведении измерения. Следует снять манометр и проверить кран и шлифы. При необходимости удаляют смазку с помощью ватного тампона, слегка смоченного спиртом, наносят новый слой смазки и повторяют определение.

Определение h_1 . Открывают краны, манометры переносят на специальную стойку и удаляют приставшую к сосудикам воду. Сосудики снимают со шлифов и аккуратно отбирают из них 8—10 мл воды. Объем отобранной и оставшейся воды записывают. Сосудики вновь притирают к шлифу манометров, укрепляют резиновыми колечками и переносят в термостат при открытых кранах манометров. Спустя 10 мин, как и при определении h_2 , жидкость в манометрах доводят до деления 50, затем закрывают краны и ее уровень справа поднимают до уровня 150. При этом в левом колене жидкость не достигает деления 280, а останавливается ниже, например на делении 195. Если при повторных определениях получают совпадающие результаты (колебания уровня жидкости в левом колене манометра незначительны), то манометры снимают и с открытыми кранами переносят на стойку.

Пример расчета V_x .

Пусть $h_2=130$ мм (280—150); $h_1=45$ мм (195—150); количество отобранной воды $a=10$ мл. Тогда объем газового пространства равен $V=10+V_x$.

$$V_x = \frac{ah_2}{h_2 - h_1}.$$

Подставляя в формулу экспериментальные величины, получаем

$$V_x = \frac{10 \cdot 130}{130 - 45} = 15,3 \text{ см}^3.$$

Таким образом, объем газового пространства $V=10+15,3=25,3 \text{ см}^3$.

Зная величины V , можно вычислить константу сосудика. Для этого также необходимо знать, какое количество жидкости будет введено в сосудик и его отростки, или реторточки (т. е. на сколько кубических сантиметров уменьшится объем газового пространства); выделение или поглощение какого газа будет определяться; при какой температуре будет проводиться опыт.

Объем сосудика с прилегающими частями манометра равен V , см³. Объем газа в этом пространстве, приведенный к нормальным условиям (0° С и давление 760 мм рт. ст.), выразится в кубических сантиметрах величиной

¹ Так как при проведении эксперимента отсчеты обычно делают при уровне манометрической жидкости в правом колене «150», то и при определении объема сосудика удобно сжимать объем газа, доводя уровень жидкости в манометре до той же величины. В противном случае при расчете объема газового пространства надо вводить поправку на объем газа, заключенного в манометрической трубке от деления 150 до деления, при котором производилось определение газового пространства.

$$V \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P-B)}{P_0},$$

где T — температура термостата при проведении опыта, выраженная в единицах абсолютной шкалы $(273 + t^\circ\text{C})^2$; P — парциальное давление определяемого газа в начале опыта; B — давление водяного пара; P_0 — атмосферное давление, равное 760 мм рт. ст. или 10 000 мм жидкости, использованной для заполнения манометра³.

Однако этот объем должен быть еще уменьшен на количество жидкости V_1 , введенной в сосудик. Следовательно, количество газа, имеющееся в газовом пространстве в начале опыта, равно:

$$(V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P - B)}{P_0}.$$

С другой стороны, жидкость, введенная в сосудик, содержит некоторое количество растворенного газа, зависящее от объема жидкости (V_1), коэффициента растворимости в ней газа (α), температуры T и парциального давления газа $(P - B)$. Количество (объем) растворенного газа, приведенное к нормальным условиям, равно:

$$V_1 = \alpha \cdot \frac{(P - B)}{P_0}.$$

Таким образом, общий объем газа, находящегося в газовом пространстве в начале опыта, равен:

$$(V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P - B)}{P_0} + V_1 \alpha \cdot \frac{(P - B)}{P_0}.$$

Если во время опыта будет происходить поглощение газа (например, O_2), то давление в системе понизится на h миллиметров манометрической жидкости ($-h$); если, наоборот, будет происходить выделение газа (например, CO_2), то давление соответственно повысится ($+h$).

В случае поглощения газа и падения давления на h мм, количество (объем) исследуемого газа в газовом пространстве системы в конце опыта будет равно:

$$(V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P - B - h)}{P_0};$$

количество газа, растворенного в жидкости:

$$V_1 \alpha \frac{(P - B - h)}{P_0}.$$

Следовательно, общее количество (общий объем) исследуемого газа в конце опыта окажется равным:

$$(V - V_1) \frac{273}{T} \frac{(P - B - h)}{P_0} + V_1 \alpha \frac{(P - B - h)}{P_0}.$$

² Обычно константу устанавливают при комнатной температуре.

³ Нормальное давление равно 760 мм рт. ст.; удельный вес ртути — 13,6. Удельный вес манометрической жидкости равен 1,03. Отсюда находят нормальное давление манометрической жидкости в миллиметрах:

$$P_0 = \frac{760 \cdot 13,6}{1,03} = 10\,000.$$

Количество (объем) поглощенного газа (X) будет равно разности между количеством (объемом) газа в начале и в конце опыта:

$$\begin{aligned} X &= (V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P - B)}{P_0} + V_1 \alpha \frac{(P - B)}{P_0} - \\ &- \left[(V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P - B - h)}{P_0} + V_1 \alpha \frac{(P - B - h)}{P_0} \right] = \\ &= (V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P - B)}{P_0} + V_1 \alpha \frac{(P - B)}{P_0} - \\ &- (V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{(P - B - h)}{P_0} - V_1 \alpha \frac{(P - B - h)}{P_0} = \\ &= (V - V_1) \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{h}{P_0} + V_1 \alpha \frac{h}{P_0} = h \left[\frac{(V - V_1) \cdot \frac{273}{T} + V_1 \alpha}{P_0} \right] = hK. \end{aligned}$$

Выражение в квадратных скобках представляет собой константу K данного сосуда, h — разность уровней манометрической жидкости в начале и конце опыта.

Чтобы дать числовое выражение константе, необходимо лишь подставить соответствующие величины. Пусть V нашего прибора составляет 25,3 см³, а объем жидкости в сосудике и его отростках, или реторточках, V_1 равен 4 см³. Решено работать при температуре 37°C (310 К по абсолютной шкале) и исследовать поглощение O_2 , коэффициент растворимости которого α при 37°C в физиологическом солевом растворе равен 0,0239.

Так как поглощение или выделение газа при манометрических определениях обычно выражают в кубических миллиметрах, то для вычисления константы пользуются формулой

$$K = \frac{(V - V_1) \cdot \frac{273}{T} + V_1 \alpha}{P_0} \cdot 1000.$$

В нашем случае константа будет равна:

$$\begin{aligned} K &= \frac{\left[(25,3 - 4,0) \cdot \frac{273}{310} + 4,0 \cdot 0,0239 \right] \cdot 1000}{10,000} = \\ &= \frac{21,3 \cdot \frac{273}{310} + 0,0956}{10} = \frac{18,7578 + 0,0956}{10} = \frac{18,8534}{10} = 1,88. \end{aligned}$$

Найденная величина константы прибора действительна только для определенных условий опыта (t° , V и данного газа). Изменяя условия опыта (температуру, объем введенной жидкости), исследуя поглощение или выделение другого газа, вычисляют новую величину константы прибора.

Термобарометр

При выведении уравнения для вычисления константы сосуда K фигурировала величина P , означающая начальное атмосферное давление, которое, как считалось, остается постоянным на всем протяжении

нии опыта. В действительности же атмосферное давление и температура термостата могут в течение опыта меняться. Для учета этих изменений во время опыта ставят термобарометр — манометр с сосудиком, содержащим некоторое количество воды.

Изменение давления в опытных сосудиках обусловлено изменением содержания газа, например поглощением O_2 или выделением CO_2 в ходе протекающей в сосудике реакции, а также изменениями температуры термостата и давления окружающей среды за время опыта. В термобарометре изменение давления за тот же период времени обусловлено изменениями только температуры термостата и атмосферного давления. Поэтому в величину h (изменение давления в опытных сосудиках), выраженную разностью уровней манометрической жидкости в начале и конце опыта, вносят поправку, учитывая величину h термобарометра:

$$h_{\text{оп}} - h_{\text{термобар}} = \Delta h.$$

Пример. Исследуется поглощение кислорода и декарбоксилирование:

Исследуемый процесс	Показание				Поправка по термобарометру, $h_{\text{терм}}$	Изменение давления в опытном сосудике, $h_{\text{опыт}}$	Исправленное изменение давления, Δh
	термобарометра		опытного сосудика				
	начальное	конечное	начальное	конечное			
Поглощение	250	248	250	211	—2	—39	—37
Декарбоксилирование	150	148	150	248	—2	98	100

Для определения количества поглощенного или выделившегося в процессе реакции газа на константу прибора умножают истинное изменение давления в сосудике, найденное с учетом показаний термобарометра.

ЛИТЕРАТУРА

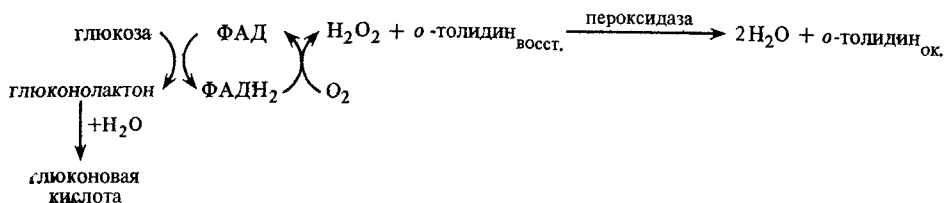
1. Умбрайт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., 1951.
2. Пешкова В. М., Громова М. И. Практическое руководство по спектрофотометрии и колориметрии. 2-е изд., перераб. и доп. М., 1965.
3. Методы практической биохимии/Под ред. Б. Уильямса, К. Уилсона. М., 1978.
4. Практикум по биохимии/Под ред. Н. П. Мешковой и С. Е. Северина. М., 1979.
5. Практикум по физико-химическим методам в биологии/Под ред. Ф. Ф. Литвина. М., 1981.

II. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ОБМЕНА

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Метод основан на специфическом окислении глюкозы под влиянием глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4) и позволяет определить содержание глюкозы в крови и в тканях в присутствии других редуцирующих веществ.

Глюкозооксидаза обладает чрезвычайно высокой субстратной специфичностью по отношению к β -D-глюкозе. Ее простетической группой является флавинадениндинуклеотид (ФАД). При окислении глюкозы образуется эквимолекулярное количество перекиси водорода, которая в присутствии пероксидазы (КФ 1.11.1.7) окисляет *o*-толидин. Восстановленный *o*-толидин (бесцветный, лейкоформа) превращается в *o*-толидин окисленный (окрашенный). Интенсивность возникшей синей окраски измеряют на ФЭКе при длине световой волны 620 нм.



Определение проводят после осаждения белков щелочным раствором цинка:

Реактивы:

1. NaCl — 0,9%-ный раствор.
2. Цинк сернокислый ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) — 5%-ный раствор.
3. NaOH — 0,3 н. раствор.
4. *o*-толидин — 1%-ный раствор на 96%-ном этиловом спирте (в темной плотно закрытой склянке раствор может храниться несколько месяцев).
5. Ацетатный буфер — 0,25 М раствор, pH 4,8.
6. Пероксидаза из хрена, кристаллический препарат.
7. Препарат глюкозооксидазы (коммерческий).
8. Стандартные растворы глюкозы — 50, 70, 100, 120, 150 мг% готовят на растворе бензойной кислоты (100 мг на 100 мл дистиллированной воды) ⁴. В холодильнике могут храниться длительное время.

Рабочий реактив для определения глюкозы готовится за 1—2 ч до употребления. В 80 мл ацетатного буфера (pH 4,8) растворяют 1 мг глюкозооксидазы и 1 мг пероксидазы, приливают 1 мл 1%-ного раствора *o*-толидина и доводят объем до 100 мл ацетатным буфером. Реактив может храниться в холодильнике в темных склянках в течение нескольких суток.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

В центрифужных пробирках смешивают 1,1 мл 0,9%-ного раствора NaCl, 0,4 мл 5%-ного раствора сернокислого цинка и 0,4 мл 0,3 н. раствора NaOH. К смеси добавляют 0,1 мл крови (в качестве противосвертывающего средства можно использовать гепарин, натриевые и калиевые соли щавелевой или лимонной кислот). При определении глюкозы непосредственно в момент взятия крови антикоагулянты можно не применять. Смесь хорошо перемешивают и через 10 мин белки

⁴ Пропись приготовления стандартного раствора глюкозы и построения калибровочного графика для опытов по изучению гликолиза см. на с. 52.

удаляют центрифугированием при 2500—3000 об/мин в течение 10—15 мин.

К 1 мл центрифугата приливают 3 мл рабочего реактива, перемешивают и развившуюся синюю окраску колориметрируют в кювете шириной 5 мм. Окраска стабильна в течение нескольких минут. Время, необходимое для развития максимальной окраски, зависит от активности глюкозооксидазы и должно быть найдено экспериментально. Для этого берут одну из проб и начиная с 10-й минуты измеряют на ФЭКе ее оптическую плотность. После установления времени, необходимого для развития в пробе максимальной окраски, проводят фотометрирование всех остальных проб⁵. В контрольную пробу берут 1 мл дистиллированной воды и 3 мл рабочего реактива.

Ввиду того что серноокислый цинк и щелочь частично ингибируют глюкозооксидазу, для построения стандартного графика к 0,1 мл раствора глюкозы приливают хлористый натрий, серноокислый цинк и едкий натр в тех же количествах, которые использовались для осаждения белков крови. После центрифугирования отбирают из стандартных проб по 1 мл раствора и добавляют по 3 мл рабочего реактива. Стандартный график строят для каждой серии определений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ (МАНОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД)

Активность глюкозооксидазы определяют по количеству поглощенного кислорода при окислении глюкозы. Поглощение кислорода определяют манометрическим методом Варбурга (с 10).

Реактивы:

1. Фосфатный (или ацетатный) буфер — 0,1 М раствор, рН 5,8.
2. Глюкоза — 7%-ный раствор, приготовленный на буферном растворе за 1—2 ч до начала определения.
3. Глюкозооксидаза — раствор на фосфатном (ацетатном) буфере, содержащий около 0,5—0,6 единиц активности (Е) в 1 мл (препараты глюкозооксидазы Львовского завода бакпрепаратов имеют активность от 20 до 200 000 Е/г).

В центральную часть сосуда Варбурга помещают 1 мл раствора глюкозооксидазы и 0,4 мл буферного раствора, рН 5,8. В боковую реторточку с длинным тубусом наливают 1 мл раствора глюкозы. Сосудики пришлифовывают к манометрам, которые при открытых кранах переносят в водяной термостат, отрегулированный на 26°С, и оставляют на 10—15 мин для выравнивания температуры. После этого подводят уровень жидкости в обоих коленах манометра к метке 250, закрывают краны и отсчитывают уровень жидкости в левом (открытом) колене. Повертывают реторточки так, чтобы жидкость из них по возможности вся попала в центральную часть сосуда, и включают качающий механизм. Через каждые 10 мин его останавливают, при закрытых кранах доводят уровень жидкости в правом колене манометра до метки 250 и записывают показание левого колена. Для учета изменения давления за счет колебания температуры в термостате и изменения барометрического давления во время опыта одновременно

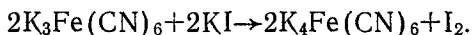
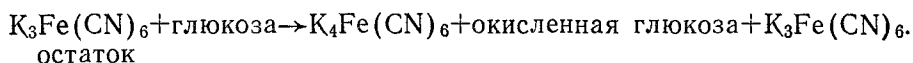
⁵ Если за 10—15 мин окраска не достигнет максимума, это указывает на низкую активность глюкозооксидазы. В таком случае при приготовлении рабочего реактива ее количество следует увеличить.

с опытными пробами ставят термобарометр (с. 17). Зная константы сосудиков, вычисляют количество поглощенного кислорода в микролитрах за 1 мин. Одна единица активности глюкозооксидазы соответствует поглощению 1 мкмоль O_2 за 1 мин

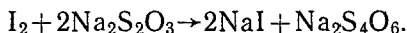
Рассчитывают число единиц активности в 1 г сухого препарата глюкозооксидазы.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ФЕРРИЦИАНИДНЫМ МЕТОДОМ

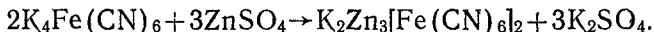
Метод Хагедорна—Иенсена позволяет определять сахар в небольшом количестве крови (0,1 мл). В основу метода положена реакция восстановления красной кровяной соли (феррицианид калия, железосинеродистый калий, $K_3Fe(CN)_6$) в щелочной среде в присутствии глюкозы и некоторых редуцирующих веществ (мочевой кислоты, глутатиона, креатина, креатинина и др.) в желтую кровяную соль (железистосинеродистый калий, ферроцианид калия, $K_4Fe(CN)_6$). Остаток невосстановленного $K_3Fe(CN)_6$ определяют йодометрическим титрованием в кислой среде:



остаток



Реакция восстановления феррицианида калия обратима, поэтому ее ведут в присутствии сернокислого цинка. Феррицианид калия выпадает в осадок в виде двойной соли $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ и выводится из реакции



Белки, по Хагедорну—Иенсену, осаждают гидратом окиси цинка. Для уменьшения количества редуцирующих веществ, завышающих содержание глюкозы в крови, ряд авторов предложили пользоваться в качестве осадителя белков гидратом окиси кадмия. При этом осадителе все редуцирующие вещества, содержащиеся в крови, кроме глюкозы, креатина и креатинина, осаждаются кадмием. В дальнейшем определение глюкозы проводят по методу Хагедорна—Иенсена. В этом случае получают более низкие значения, которые почти полностью соответствуют содержанию глюкозы в крови.

Реактивы:

1. $Na_2S_2O_3$ (гипосульфит) — 0,005 н. раствор (готовят перед определением из 0,1 н. раствора), проверяют титрованием.
2. $K_3Fe(CN)_6$ (красная кровяная соль) — 0,005 н. раствор: 1,65 г перекристаллизованного $K_3Fe(CN)_6$ растворяют в 1 л дистиллированной воды, содержащей 10,6 г хорошо прокаленного или безводного Na_2CO_3 .
3. Глюкоза.
4. $NaOH$ — 0,1 н. раствор.
5. $NaOH$ — 1,1 н. раствор.
6. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,45%-ный раствор.
7. $CdSO_4$ — 1,3%-ный раствор (13 г $CdSO_4$, 63,5 мл 1 н. H_2SO_4 и воды до 1 л).
8. H_2SO_4 — 1 н. раствор.

9. CH_3COOH — 3%-ный раствор.
10. Крахмал — 1%-ный раствор на насыщенном растворе NaCl
11. Иод-цинковый тройной раствор: 5 г KI , 10 г ZnSO_4 , 50 г NaCl растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Реактив нестойк, так как KI легко разлагается на свету. Поэтому заранее готовят реактив без него, а KI добавляют перед проведением анализа.

Осаждение белков гидратом окиси цинка в щелочной среде.
В четыре пробирки наливают по 5 мл 0,45%-ного раствора серноуксусного цинка и по 1 мл 0,1 н. раствора NaOH , все тщательно перемешивают. В две пробирки с помощью микропипетки помещают по 0,1 мл свежезятой крови⁶ (или 0,1 мл исследуемого раствора, содержащего от 0,1 до 0,3 мг глюкозы). Пипетку двукратно промывают тем же раствором, набирая и выпуская его обратно в пробирку.

Кроме опытных ставят две контрольные пробы, содержащие одни реактивы без исследуемого раствора. Все пробирки помещают на 3 мин в кипящую водяную баню. Осадок удаляют, фильтруя содержимое пробирок в специальные стаканчики размером 3×10 см. Фильтры заранее промывают горячей дистиллированной водой. Пробирки ополаскивают дважды 2 мл горячей дистиллированной воды. Промывные воды фильтруют в те же стаканчики, через те же фильтры.

Осаждение белков гидратом окиси кадмия в щелочной среде.
В четыре пробирки наливают по 2 мл CdSO_4 . В две из них микропипеткой вносят по 0,1 мл крови и микропипетку промывают два раза той же жидкостью. В другие пробирки вносят по 0,1 мл дистиллированной воды (контроль). Через 5 мин во все пробы приливают по 1 мл разведенного в 4 раза 1,1 н. раствора NaOH и нагревают 3 мин на кипя-

Таблица 2

Гипосульфит	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,164	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,043	0,042	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Примечание. Содержание сахара выражено в миллиграммах.

⁶ Необходимо следить за тем, чтобы с внешней стороны пипетки не осталось крови.

щей бане. В дальнейшем поступают согласно методу Ландорна—Кенсена.

Определение глюкозы. К фильтрату в каждый стаканчик приливают, точно отмерив, по 2 мл титрованного раствора $K_3Fe(CN)_6$ (0,005 н.), перемешивают и стаканчики ставят на 15 мин в кипящую водяную баню. Затем пробы охлаждают, приливают по 3 мл тройного раствора (в раствор входит $NaCl$, $ZnSO_4$ и KI) и по 2 мл 3%-ного раствора CH_3COOH . Раствор желтеет за счет выделившегося йода. В пробы добавляют по 2 капли крахмала и выделившийся йод титруют из микробюретки гипосульфитом до исчезновения синего окрашивания.

Содержание сахара вычисляют по таблице, составленной для 0,005 н раствора гипосульфита (табл. 2).

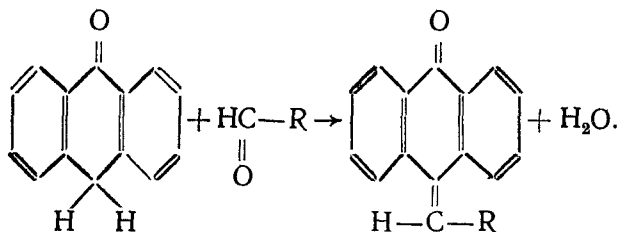
Цифры первого вертикального столбца соответствуют целым и десятиым долям миллилитров гипосульфита, пошедшего на титрование, а цифры верхней горизонтальной строчки — сотым долям. Число, оказавшееся на месте пересечения вертикальной и горизонтальной линий, проведенных из точек, характеризующих количество пошедшего на титрование гипосульфита, соответствует количеству редуцирующих веществ в миллиграммах глюкозы для данной пробы. Разность между значениями, найденными для опытной и контрольной проб (контроль показывает восстанавливающее действие самих реактивов), указывает на содержание сахара в 0,1 мл крови. Содержание глюкозы в пробе может быть рассчитано по формуле:

$$x = \frac{0,385a}{2},$$

где x — количество глюкозы в пробе, мг; 0,385 — количество глюкозы, окисляемой 2 мл 0,005 н. раствора феррицианида; a — количество 0,005 н. раствора гипосульфита, пошедшего на титрование глюкозы в опытной пробе.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ И ГЛИКОГЕНА С АНТРОНОМ

Производные углеводов типа фурфуролов, образующиеся при нагревании глюкозы с концентрированной серной кислотой, дают с антроном окрашенные соединения. По интенсивности окраски судят о количестве глюкозы.



Развившаяся окраска пропорциональна количеству взятой глюкозы в пределах от 10 до 100 мкг в пробе.

Реактивы:

1. Антрон — 0,2%-ный раствор, приготовленный на 95%-ном растворе H_2SO_4 . Раствор готовят перед определением и ставят в лед.

2. Глюкоза — стандартный раствор (1 мл содержит 40 мкг глюкозы), приготовлен на растворе бензойной кислоты (с. 19).
3. КОН — 30%-ный раствор.

Определение глюкозы. В широкие пробирки, стоящие во льду, помещают по 2,5 мл исследуемого раствора, содержащего 10—100 мкг глюкозы, и при встряхивании приливают по 5 мл свежеприготовленного раствора антрона. Пробы тщательно перемешивают и ставят в водяную баню при 90°С. Через 10 мин пробы охлаждают в бане с ледяной водой и развившуюся зеленую со слабым синеватым оттенком окраску фотометрируют при 620 нм (окраска стабильна при комнатной температуре в течение нескольких часов). Одновременно с исследуемыми растворами ставят контрольную пробу с дистиллированной водой и со стандартным раствором несколько проб (с различными количествами глюкозы) для построения калибровочного графика.

Определение гликогена. Исследуемую пробу предварительно обрабатывают щелочью для разрушения простых сахаров. При высоком содержании гликогена в пробе определение проводят «прямым» методом, т. е. непосредственно из раствора. «Прямой» метод применяется при определении гликогена в ткани печени, в опытах с добавлением гликогена. Если содержание гликогена в пробе мало, то перед определением его осаждают спиртом — «непрямой» метод. Предварительное отделение гликогена в этом случае необходимо потому, что окраску с антроном дают также и продукты гидролиза белка, и при небольших количествах гликогена это не может не сказаться на результатах определения.

«Прямой» метод. В пробирки, содержащие 25—100 мг ткани, 1 мл гомогената или безбелкового раствора, добавляют по 3 мл 30%-ного раствора едкого калия. Пробы закрывают пробками и помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. После этого раствор охлаждают до комнатной температуры, содержимое пробирок количественно переносят в мерные колбочки на 25—50 мл в зависимости от содержания гликогена в пробах (1 мл получаемого раствора должен содержать от 3 до 30 мкг гликогена) и объем доводят водой до метки. В широкие пробирки берут по 2,5 мл полученного раствора, ставят их в лед, добавляют при встряхивании 5 мл раствора антрона, тщательно перемешивают, погружают на 10 мин в водяную баню при 90°С, затем охлаждают и фотометрируют при 620 нм.

Параллельно с исследуемыми растворами ставят контрольную пробу с дистиллированной водой и пробы со стандартными растворами глюкозы.

Для расчета содержания гликогена найденное по калибровочному графику количество глюкозы (калибровочный график строится по глюкозе) умножают на коэффициент 0,9, так как молекулярный вес глюкозного остатка в гликогене равен 162, а молекулярный вес глюкозы — 180 ($162 : 180 = 0,9$).

«Непрямой» метод. В центрифужную пробирку берут 25—100 мг исследуемой ткани, 1 мл гомогената или безбелкового фильтрата, добавляют 3 мл 30%-ного раствора КОН и нагревают в кипящей водяной бане в течение 20 мин. Затем пробы охлаждают, добавляют равный объем (4 мл) спирта, хорошо перемешивают стеклянной палочкой и помещают в кипящую водяную баню. Когда спирт закипит, пробы охлаждают и осадок гликогена отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают, осадок гликогена растворяют в 1 мл дистиллированной воды

и снова осаждают равным объемом спирта, нагревая пробу до кипения в кипящей водяной бане. Осадок гликогена отделяют центрифугированием, подсушивают на воздухе, растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды и проводят колориметрическое определение, как указано выше.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА ПОСЛЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ГЛЮКОАМИЛАЗОЙ ИЗ *ASPERGILLUS NIGER*

Гликоген отделяют от мешающих определению веществ (глюкозы, сахарозы, гексозофосфатов, глицерина) путем осаждения спиртом на фильтровальную бумагу, затем гидролизуют глюкоамилазой (КФ 3.2.1.3) и определяют энзиматическим методом с глюкозооксидазой.

Реактивы:

1. Этиловый спирт — 66%-ный раствор.
2. Трихлоруксусная кислота — 10%-ный раствор.
3. Ацетон.
4. Глюкоамилаза (10 мг фермента растворяют в 1,0 мл H_2O , осадок удаляют центрифугированием).
5. Ацетатный буфер — 0,1 М раствор, pH 4,8.
6. Реактивы для определения глюкозы глюкозооксидазным методом (с. 19).

10—100 мкл исследуемого раствора, содержащего 10—50 мкг гликогена, наносят на квадратики фильтровальной бумаги размером 2×2 см. Их сразу же помещают в бюксы с 10 мл смеси 66%-ный этанол — 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, стоящие на льду (отдельно для каждого образца). Через 10 мин смесь заменяют тем же объемом 66%-ного этанола комнатной температуры и эту процедуру повторяют 3 раза в течение часа. Затем каждый квадратик бумаги помещают на 5 мин в ацетон, сушат под лампой в течение 10 мин, измельчают ножницами и помещают в пробирку, в которую приливают 0,9 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,8) и 0,1 мл раствора глюкоамилазы. Пробу перемешивают и инкубируют в течение 3 ч при 30° С. В качестве контроля используют пробу, содержащую измельченный квадратик чистой фильтровальной бумаги такого же размера. По окончании инкубации к каждой пробе приливают по 3 мл рабочего реактива для определения образовавшейся глюкозы глюкозооксидазным методом. Определение проводят, как указано на с. 20. Количество гликогена рассчитывают по калибровочному графику, построенному по глюкозе, учитывая коэффициент пересчета, равный 0,9 (с. 24).

5. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Выделение гликогена из печени кролика или крысы состоит в экстракции ткани 3%-ным раствором трихлоруксусной кислоты и последующего осаждения этиловым спиртом.

Реактивы:

1. Трихлоруксусная кислота — 3%-ный раствор.
2. Этиловый спирт — 96%.

Печень тщательно растирают в ступке с полуторакратным объемом 3%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и небольшим коли-

чеством промытого песка⁷ для более полного разрушения клеток. Полученный экстракт центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. При содержании в печени большого количества гликогена супернатант представляет собой жидкость молочного цвета. Ее сливают в стакан, а осадок снова растирают с равным объемом 3%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, центрифугируют и второй супернатант объединяют с первым. Если гликогена в печени мало и первый экстракт представляет только опалесцирующий раствор, то второй экстракции не проводят. К раствору гликогена приливают равный объем 96%-ного этанола и тщательно перемешивают. Осадок гликогена собирают центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин, а затем гомогенизируют в 2—3 объемах, бидистиллированной воды. Приливают равный объем этанола, перемешивают и снова центрифугируют. Эту операцию повторяют 3—4 раза, после чего осадок гликогена промывают два раза 96%-ным этанолом и высушивают в вакуумэкссикаторе над свежепрокаленным хлористым кальцием.

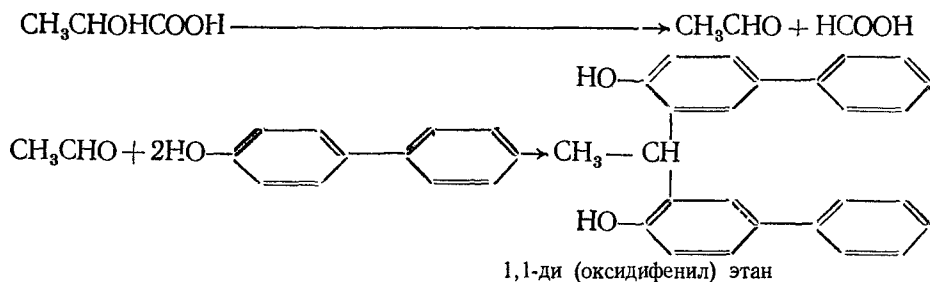
Стадию многократного переосаждения гликогена спиртом можно заменить диализом. В этом случае осадок гликогена после гомогенизирования в 2—3 объемах дистиллированной воды подвергают диализу против дистиллированной воды (с пятикратной сменой через каждые 2 ч), а затем сушат с помощью лиофильной сушилки.

Выход гликогена колеблется в зависимости от упитанности животного. Для увеличения содержания гликогена в печени рекомендуется кролику за 2—3 ч до опыта ввести под кожу или в брюшную полость 10—15 г глюкозы в виде 20—40%-ного раствора.

6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД С *n*-ОКСИДИФЕНИЛОМ

Метод основан на измерении интенсивности окраски соединения, образующегося в процессе реакции ацетальдегида с *n*-оксидифенилом в присутствии H_2SO_4 . Ацетальдегид образуется при нагревании молочной кислоты с минеральными кислотами. При его взаимодействии с двумя молекулами *n*-оксидифенила образуется диоксидифенилэтан, который в присутствии H_2SO_4 окисляется в продукт фиолетового цвета с максимумом поглощения при 574 нм. Состав окрашенного производного не известен.



Метод позволяет определить молочную кислоту в количествах от 0,03 до 0,2 мкмоль в пробе.

⁷ Кварцевый или речной песок промывают вначале 5%-ным раствором HCl , затем дистиллированной водой до исчезновения кислой реакции в промывных водах, отсасывают на воронке Бюхнера и прокаливают в муфельной печи.

Реактивы:

- 1 Молочнокислый кальций — стандартный раствор (может быть приготовлен из молочнокислого лития или молочнокислого цинка) — $0,25 \cdot 10^{-3}$ М раствор.
- 2 *n*-оксидифенил — 1,5%-ный раствор в 0,5%-ном NaOH. Навеску *n*-оксидифенила (75 мг) помещают в коническую пробирку и растворяют в 0,5 мл 5%-ного раствора NaOH, затем добавляют 4,5 мл кипяченной теплой дистиллированной воды. Раствор хранят при комнатной температуре в темноте. Пробирку удобно закрыть пробкой, снабженной капилляром.
- 3 H_2SO_4 (х. ч.), удельный вес — 1,84
- 4 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (х. ч.) — 20%-ный раствор
- 5 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (х. ч.) — 4%-ный раствор.
- 6 CaO (в порошке)
- 7 CCl_3COOH — 5%-ный раствор.

В центрифужные пробирки вносят 2—3 мл безбелкового трихлоруксусного фильтрата, для удаления углеводов добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора медного купороса, доводят объем до 5 мл, добавляют 0,5 г окиси кальция и тщательно перемешивают. Спустя полчаса центрифугируют, отбирают 0,5 мл прозрачного центрифугата в чистые и сухие пробирки⁸, помещают их в ледяную воду, приливают одну каплю 4%-ного раствора сернокислой меди для уменьшения окислительного потенциала и медленно при постоянном перемешивании добавляют 3 мл концентрированной серной кислоты. Пробирки ставят в кипящую водяную баню на 5 мин (при этом происходит превращение молочной кислоты в ацетальдегид), затем пробы охлаждают до 20° С в холодной воде, добавляют в каждую пробирку по две-три (0,05 мл) капли щелочного раствора *n*-оксидифенила, осторожно перемешивают и ставят в водяную баню при 30° С. Через 30 мин пробирки погружают точно на 90 с в кипящую водяную баню, затем охлаждают до комнатной температуры и фотометрируют. Параллельно ставят пробы со стандартными растворами, содержащими различные количества молочной кислоты. Пробы обрабатывают так же, как и опытные. Строят калибровочный график, по которому определяют содержание молочной кислоты в опытных пробах.

Интенсивность развившейся фиолетовой окраски пропорциональна концентрации молочной кислоты (при содержании ее в колориметрируемых пробах от 0,03 до 0,2 мкмоль). При более высоком содержании молочной кислоты необходимо развести трихлоруксусный фильтрат дистиллированной водой и после этого повторить определение.

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Метод основан на энзиматическом окислении молочной кислоты в пировиноградную ферментом лактатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.27) при одновременном восстановлении никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) в НАДН (с. 7).

Равновесие реакции сдвинуто в сторону образования молочной кислоты. Однако, если образующуюся пировиноградную кислоту связывать гидразином или семикарбазидом в виде гидразонов или семи-

⁸ Пробирки должны быть безукоризненно чистыми, обезжиренными и сухими (мыть горячей хромовой смесью, много раз промывать водопроводной и дистиллированной водой, сушить в сушильном шкафу и хранить в отдельной коробке).

карбазонов (с. 32) и реакцию проводить в щелочном буфере, молочную кислоту можно полностью перевести в пировиноградную. О количестве молочной кислоты судят по количеству образовавшегося НАДН, измеряя оптическую плотность при 340 нм (с. 7).

Реактивы:

1. Глицин-гидразиновый буфер, рН 9,0 (глицин — 0,1 М раствор, содержащий 0,1 М гидразин) ⁹.
2. НАД⁺ — $3 \cdot 10^{-2}$ М раствор, рН 6,0.
3. Калий-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,4.
4. Лактатдегидрогеназа — 2 мг/мл (коммерческий препарат) или экстракт мышц в разведении 1:25 (как источник фермента). Растворы НАД и фермента необходимо держать на льду.
5. HClO₄ — 0,5 н. раствор.
6. NaOH — 2 н. раствор.
7. HCl — 2 н. раствор.
8. KOH — 5 н. раствор.
9. Раствор молочнокислого лития или молочнокислого кальция (его концентрацию рассчитывают по формуле на с. 7).

Приготовление глицин-гидразинового буфера. Растворяют навески глицина и гидразина в небольшом количестве дистиллированной воды, доводят рН смеси 2 н. раствором NaOH до 9,0 (рН измеряют на потенциометре стеклянным электродом) и доливают дистиллированной водой до 100 мл.

Получение экстракта мышц. Мышцы задних конечностей только что декапитированной ¹⁰ крысы используют для получения экстракта, не содержащего митохондрий, как указано на с. 50. Экстракт можно долго хранить в замороженном виде: его разливают по 1 мл в пробирки и замораживают. Для определения молочной кислоты используют экстракт в разведении 1:25 (разводят 0,1 М раствором калий-фосфатного буфера, рН 7,4).

Заполнение проб для определения молочной кислоты

Состав пробы	Объем, мл	
	контроль-ная	опытная
1. Глицин-гидразиновый буфер	2,6	2,6
2. Раствор НАД	0,2	0,2
3. Раствор фермента или экстракт	0,1	0,1
4. H ₂ O'	0,1	—
5. Исследуемый раствор	—	0,1

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в термостат при 25°С на 60 мин. После инкубации пробы охлаждают, устанавливая «ноль» спектрофотометра по контролю и измеряют оптическую плотность пробы. Количество молочной кислоты в пробе рассчитывают учитывая все разведения.

⁹ Вместо глицин-гидразинового буфера можно использовать глицин-семикарбазидный буфер, рН 9,0 (глицин 0,1 М раствор, содержащий 0,1 М семикарбазид).

¹⁰ В дальнейшем, если не оговаривается специально, крысу непосредственно перед опытом эвтаназируют мгновенной декапитацией.

При налаживании энзиматического метода определения молочной кислоты используют раствор молочнокислого лития или кальция. Количество соли молочной кислоты, которое необходимо поместить в кювету спектрофотометра, рассчитывают по формуле, приведенной на с. 7.

При определении содержания молочной кислоты в биологическом материале ткань только что убитого животного помещают в ступку, замораживают жидким азотом и растирают, постоянно подливая жидкий азот (ткань не должна размораживаться). Берут навеску растертой ткани¹¹, заливают 5-кратным объемом холодного 0,5 М раствора HClO_4 , экстрагируют на холоде 30 мин. Белки удаляют центрифугированием.

Центрифугат нейтрализуют рассчитанным количеством 5 н. раствора KOH и оставляют на льду или в холодильнике не менее чем на 1 ч (можно оставить на ночь). Осадок перхлората калия KClO_4 удаляют центрифугированием при 2°—4° С. В полученном растворе определяют молочную кислоту, как указано выше.

7. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

МАНОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

Пировиноградная кислота под влиянием пируватдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.1) подвергается декарбоксилированию с образованием эквивалентных количеств углекислого газа и ацетальдегида:



Для количественного определения пировиноградной кислоты реакцию ведут в кислой среде. Выделяющийся углекислый газ определяют манометрически в аппарате Варбурга по увеличению парциального давления (с. 10). В качестве источника пируватдекарбоксилазы используют экстракт пивных дрожжей.

Реактивы:

1. Ацетатный буфер — 3 М раствор, pH 5,0.
2. KH_2PO_4 — 0,5 М раствор.
3. Экстракт пивных дрожжей (готовят из заранее высушенных дрожжей).

Приготовление сухих пивных дрожжей. Хорошо отпрессованные пивные дрожжи нижнего брожения тщательно размельчают, помещают тонким слоем на фильтровальную бумагу и сушат в токе теплого (не выше 40° С) воздуха, периодически перемешивая. Высушенные дрожжи хранят в плотно закрытых стеклянных банках в холодильнике.

Получение дрожжевого экстракта. 10 г высушенных дрожжей растирают в ступке с 30 мл бидистиллированной воды до получения однородной суспензии. Суспензию переливают в мерный цилиндр объемом 100 мл и помещают его в водяной термостат при 30° С. Содержимое цилиндра время от времени перемешивают стеклянной палочкой. Цилиндр оставляют в термостате до полного прекращения брожения углеводов, содержащихся в дрожжевых клетках. Об окончании бро-

¹¹ При взятии навесок удобно пользоваться розетками и совочком из кальки.

жения судят по прекращению выделения углекислого газа. Обычно процесс заканчивается за 1—2 ч.

По окончании брожения¹² суспензию дрожжей центрифугируют с охлаждением в течение 15—20 мин при 25 000 g. Для освобождения дрожжевого экстракта от растворенного в нем углекислого газа центрифугат помещают в колбу Бунзена, стоящую во льду, добавляют к нему 0,05 объема 3 М раствора ацетатного буфера (рН 5,0) и перемешивают. Колбу закрывают резиновой пробкой со вставленной в нее стеклянной трубкой, доходящей почти до дна колбы, и через боковой отросток присоединяют на 15—20 мин к слабодействующему водоструйному насосу (рис. 3). Колбу время от времени встряхивают.

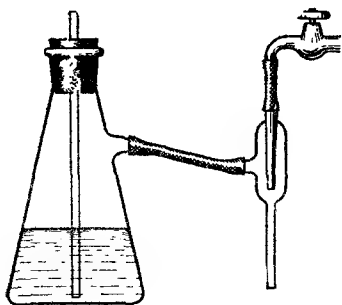


Рис. 3. Установка для удаления растворенного углекислого газа (колба Бунзена, присоединенная к водоструйному насосу)

Дрожжевой экстракт готовят непосредственно перед опытом и хранят на льду¹³, используют как препарат пируватдекарбоксилазы.

Определение пировиноградной кислоты. К исследуемому раствору пировиноградной кислоты¹⁴ приливают 0,1 объема ацетатного буфера (рН 5,0), к которому заранее добавляют 0,1 объема 0,5 М раствора KH_2PO_4 . Перемешивают и 2 мл этого раствора помещают в основное пространство сосуда Варбурга (ставят не менее двух параллельных проб). В другие сосуды вносят по 2 мл бидистиллированной воды, подкисленной так же, как и исследуемый раствор (контрольные пробы). В боковые реторточки всех сосудов помещают по 0,5 мл дрожжевого экстракта. Сосуды шлифуют к манометрам и погружают в термостатированную баню аппарата Варбурга, предварительно от-

регулированную на 26° С. Краны манометров при этом должны **быть открытыми**, а сосуды полностью погружены в воду. Пускают качающий механизм. Через 5 мин (время, необходимое для выравнивания температуры) его останавливают, направляют жидкость в обоих коленах манометра на одном уровне (например, на уровне 100). Краны манометров закрывают и продолжают встряхивание, отмечая каждые 3 мин показания манометров до тех пор, пока выделение углекислого газа, не полностью удаленного из дрожжевого экстракта, станет небольшим и одинаковым в опытных и контрольных сосудах.

После этого краны манометров открывают для выравнивания давления в сосудах, устанавливают уровень жидкости в правом колене манометра на делении 100, краны закрывают и записывают показание уровня жидкости левого (открытого) колена. Экстракт из боковой реторточки выливают в основное пространство сосуда и продолжают инкубацию, отмечая показания манометров через каждые 5 мин. Для

¹² Не следует держать суспензию дрожжей после прекращения брожения долго в термостате, так как это снижает активность пируватдекарбоксилазы.

¹³ При добавлении 1/5 объема 90%-ного глицерина экстракт может храниться в холодильнике в течение нескольких дней.

¹⁴ Раствор пировиноградной кислоты должен быть приготовлен с учетом величины константы прибора. Константа прибора — объем газа, приведенного к нормальным условиям, который должен выделиться или поглотиться в системе для смещения жидкости в манометре на 1 мм (с 12).

этого останавливают качающий механизм, при закрытых кранах доводят уровень жидкости в правом колене манометра до деления 100 и записывают показания левого колена манометра. Такие отсчеты делают до полного прекращения выделения CO_2 . Реакция должна заканчиваться за 15—20 мин. Если через 20 мин выделение углекислого газа не прекратилось, это указывает на недостаточную активность дрожжевого экстракта¹⁵. О количестве углекислого газа, выделившегося в процессе декарбоксилирования пировиноградной кислоты, судят по разности показаний манометров опытных и контрольных проб. В контрольных пробах регистрируется изменение давления, происходящее за счет неспецифического выделения CO_2 , а также за счет колебания температуры в термостате и изменения барометрического давления. Рассчитывают содержание пировиноградной кислоты в исследуемой пробе, учитывая, что из 1 моля пировиноградной кислоты выделяется 1 моль CO_2 (т. е. при нормальных условиях 22,4 л).

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Метод основан на энзиматическом восстановлении пировиноградной кислоты в молочную ферментом лактатдегидрогеназой при одновременном окислении НАДН. О количестве пировиноградной кислоты судят по убыли НАДН, измеряя уменьшение оптической плотности при 340 нм (с.7). Реакция сдвинута в сторону образования молочной кислоты при рН 7,4 и 22° С.

Реактивы

1. Калий-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,4.
2. НАДН — $3 \cdot 10^{-3}$ М раствор, рН 7,4.
3. Лактатдегидрогеназа — 2 мг/мл (коммерческий препарат) или экстракт мышц 1:25 (получение экстракта мышц см. с. 28).
4. HClO_4 — 0,5 н. раствор.
5. КОН — 5 н. раствор.
6. Раствор натриевой соли пировиноградной кислоты.

Метод предварительно отработывают со стандартным раствором пировиноградной кислоты или ее соли. Количество пировиноградной кислоты, которое необходимо внести в кювету спектрофотометра для измерения, рассчитывают по формуле (с. 7).

Содержимое опытной кюветы хорошо перемешивают и измеряют оптическую плотность при 340 нм до тех пор, пока показания не выйдут на плато (A_1). Только после этого в опытную кювету добавляют 0,1 мл исследуемого раствора и перемешивают. Вновь измеряют оптическую плотность опытной кюветы до выхода на плато (A_2). Рассчитывают количество пировиноградной кислоты по формуле (см. с. 7), где $A_{340} = A_1 - A_2$; учитывая все разведения.

При определении содержания пировиноградной кислоты в биологическом материале свежую ткань помещают в ступку, замораживают

¹⁵ Длительное выделение углекислого газа возможно также, если в растворе присутствуют кетоглутаровая или щавелевоуксусная кислоты. Эти кислоты под влиянием дрожжевого экстракта декарбоксилируются, но со значительно меньшей скоростью. Если количество этих кислот небольшое, то их декарбоксилирование можно исключить уменьшением количества дрожжевого экстракта.

жидким азотом и обрабатывают, как указано на с. 29. В полученном растворе проводят определение пировиноградной кислоты

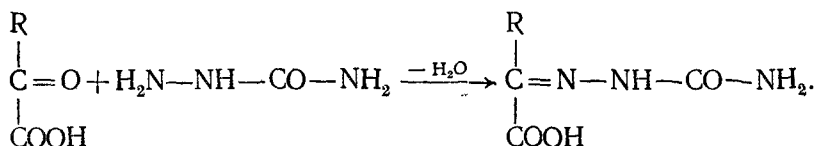
Заполнение кювет спектрофотометра для определения пировиноградной кислоты

Состав пробы	Объем, мл	
	контроль- ная	опытная
1. Калий-фосфатный буфер, рН 7,4	3,0	2,8
2. НАДН	—	0,1
3. Раствор фермента или экстракт мышц .	—	0,1

Примечание. По контрольной пробе устанавливают и проверяют ноль прибора в ходе работы.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С СЕМИКАРБАЗИДОМ

α -Кетокислоты в слабокислом растворе дают с семикарбазидом соответствующие семикарбазоны:



Семикарбазоны α -кетокислот характеризуются максимумом поглощения при строго определенной длине волны (табл. 3). По величине коэффициента молярного поглощения семикарбазона α -кетокислоты рассчитывают содержание последней в исследуемой пробе.

Коэффициент молярного поглощения семикарбазонов кетокислот

α -Кетокислота	ϵ_M	Длина волны, нм
Пировиноградная	$10,2 \cdot 10^3$	246—248
Глиоксалева	$12,4 \cdot 10^3$	252—253
α -кетоглутаровая	$10,0 \cdot 10^3$	247—248

Метод не является специфичным для пировиноградной кислоты.

Реактивы:

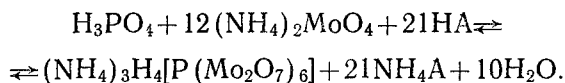
1. Ацетатный буфер — 0,2 М раствор, рН 4,5.
2. Солянокислый семикарбазид — 0,1 М раствор, приготовленный на ацетатном буфере, непосредственно перед опытом.
3. H_2SO_4 — 0,1 н. раствор.
4. Стандартный раствор пировиноградной кислоты, содержащий от 30 до 70 мкг пировиноградной кислоты в 1 мл, готовят на 0,1 н. H_2SO_4 (раствор сохраняется в холодильнике в течение 5 мес)

В кварцевую кювету спектрофотометра помещают 2,9 мл ацетат-семикарбазидного раствора, добавляют 0,1 мл исследуемого раствора пировиноградной кислоты, осторожно перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность при длине волны, характерной для семикарбазона пировиноградной кислоты. В качестве контроля используют ацетат-семикарбазидный раствор, 3 мл которого наливают во вторую кювету спектрофотометра. Метод предварительно отработывают со стандартным раствором пировиноградной кислоты, добавляя в кювету спектрофотометра 0,1 мл раствора, содержащего не более 0,08 мкмоль.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА

Определение ортофосфата используется при концентрационном анализе фосфорных эфиров углеводов и многих других фосфорсодержащих соединений, например креатинфосфата (с. 190) или АТФ (с. 187).

Колориметрические методы для определения неорганического фосфата основаны на измерении интенсивности окраски молибденовой сини¹⁶, образующейся при восстановлении фосфорномолибденовой кислоты в кислой среде. Фосфорномолибденовая кислота является продуктом реакции между фосфорной кислотой и молибденовокислым аммонием. Реакция также протекает в кислой среде:



Фосфорномолибденовая кислота относится к гетерополисоединениям — комплексным соединениям, анионы которых образованы двумя различными кислотообразующими окислами, и при этом на молекулу одного из окислов приходится несколько молекул другого. Например, фосфорномолибденовая кислота может быть представлена формулой $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 24\text{MoO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Молибденовая синь — смесь различных окислов молибдена. Возможный состав молибденовой сини: $\text{Mo}_8\text{O}_{23} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{Mo}_4\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{Mo}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Молибденовая синь в растворе находится в коллоидном состоянии, легко адсорбируется поверхностно-активными веществами. Перед фотометрированием нельзя фильтровать уже окрашенные растворы.

Отдельные методы отличаются применяемыми восстановителями и степенью кислотности среды. Кислотность среды не должна быть выше 1,25 н. От природы восстановителя зависит скорость реакции восстановления и чувствительность метода. Если в исследуемом растворе содержится белок, то необходимо его предварительно удалить.

Удаление белков. Белки из исследуемого раствора осаждают трихлоруксусной или хлорной кислотой, добавляя ее к раствору до конечной концентрации 2,5%. Раствор хорошо перемешивают, осадок белка удаляют фильтрованием или центрифугированием. Если в растворе присутствуют кислотолабильные фосфорные соединения, то фильтрование или центрифугирование проводят на холоде, а кислоту из безбелкового раствора удаляют. От трихлоруксусной кислоты можно освободиться путем повторного встряхивания раствора с 5—10-кратным объемом насыщенного водой эфира. Трихлоруксусная кис-

¹⁶ Исключение составляет метод Бенцини (с. 37)

лота переходит при этом в эфирную фракцию. После встряхивания и отстаивания эфир отсасывают водоструйным насосом. Хлорную кислоту удаляют в виде калиевой соли (KClO_4), образующейся при нейтрализации раствора 5 н. раствором КОН, как указано на с. 29. Вместо удаления кислот безбелковый раствор можно просто нейтрализовать раствором NaOH. При этом необходимо определить конечный объем пробы.

Неорганический фосфат определяют прямо из полученного безбелкового раствора. Безбелковые растворы фосфорных эфиров углеводов подвергают дополнительной обработке для отщепления ортофосфата (см. Приложение, с. 496).

По устойчивости в кислых и щелочных растворах фосфорсодержащие соединения могут быть подразделены на следующие группы:

1) лабильные фосфорные соединения — легко распадаются в кислой среде при комнатной температуре; расщепление резко ускоряется в присутствии молибденовокислого аммония;

2) легкогидролизуемые в кислоте фосфорные соединения — полностью гидролизуются за 7—10 мин в 1 н. растворе HCl при 100°C ;

3) щелочнолабильные фосфорные соединения — расщепляются в 1 н. щелочи при комнатной температуре;

4) легкогидролизуемые в щелочной среде фосфорные соединения — расщепляются в 0,2 н. щелочи при 100°C за 10 мин;

5) трудногидролизуемые фосфорные соединения — в кислых и щелочных растворах даже при 100°C в течение длительного времени подвергаются лишь слабому гидролизу.

МЕТОД ФИСКЕ—СУББАРОВ

Метод позволяет определить от 0,2 до 2 мкмоль неорганического фосфата в пробе. В качестве восстановителя в этом методе используют систему эйконоген (α -1,2,4-аминонафтолсульфоновая кислота)-сульфит, кислотность 0,75 н.

Реактивы:

1. $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ — 2,5%-ный раствор.

2. H_2SO_4 — 5 н. раствор.

3. Молибденовый реактив — смесь равных объемов молибденовокислого аммония (1) и серной кислоты (2).

4. Эйконоген (α -1,2,4-аминонафтолсульфиновая кислота)

Очистка эйконогена. В 1 л. дистиллированной воды, нагретой до 90°C , растворяют 15 г NaHSO_3 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) и 10 г Na_2SO_3 . Затем при постоянном помешивании растворяют 15 г эйконогена (температура раствора — 90°C) и фильтруют горячим через воронку с нагреванием. Фильтрат охлаждают, добавляют к нему 10 мл концентрированной HCl, перемешивают и фильтруют на воронке Бюхнера. Осадок промывают 300 мл охлажденной до 0°C дистиллированной воды, а затем спиртом. Промывают спиртом до тех пор, пока фильтр не станет бесцветным. Осадок высушивают на воздухе в темном месте. Хранят эйконоген в темной склянке.

Основной раствор: 250 мг эйконогена, 15 г NaHSO_3 (или $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 14 г) и 0,5 г Na_2SO_3 растворяют в 100 мл воды.

Рабочий раствор эйконогена: 1 объем основного раствора и 4 объема дистиллированной воды, хорошо перемешивают, если

необходимо фильтруют. Раствор может храниться в темноте несколько дней. Очистку эконогена см. выше.

5. Стандартный раствор фосфата (KH_2PO_4), содержащий 2 мкмоль фосфата в 1 мл. В качестве антисептика к раствору добавляют 1—2 капли хлороформа.

К раствору, содержащему от 0,2 до 2 мкмоль фосфата, добавляют дистиллированную воду до 2,5 мл и 1,5 мл молибденовой смеси; содержимое пробирок хорошо перемешивают. Затем во все пробы добавляют по 1 мл рабочего раствора эйконогена, все снова перемешивают и ставят в водяной термостат при 37°C на 10—15 мин или оставляют при комнатной температуре на 30—40 мин. После этого раствор охлаждают и фотометрируют при 625 нм.

Содержание фосфата в пробе рассчитывают по калибровочному графику. Для построения графика проводят определение фосфора в стандартном растворе KH_2PO_4 , беря различные его количества в пределах чувствительности данного метода, а именно от 0,2 до 2 мкмоль фосфата в пробе для колориметрирования (5 мл). Если в исследуемом растворе присутствуют лабильные фосфорные соединения, то поступают следующим образом. Определяют содержание фосфата в исходном безбелковом растворе *а* и в том же растворе после осаждения из него неорганического фосфата магниальной смесью *б* (с. 38). По разности количества фосфата, найденного в пробах (*а—б*), рассчитывают количество неорганического фосфата в исследуемом растворе.

МЕТОД ХЕРСА

Метод Херса представляет собой модификацию метода Фиске—Суббароу. Благодаря небольшому снижению кислотности (0,25 н.) он позволяет определить неорганический фосфат в присутствии легкогидролизуемых в кислой среде фосфорсодержащих соединений, таких, как АТФ, АДФ, глюкозо-1-фосфат, неорганический пиррофосфат.

Реактивы: см. определение неорганического фосфата методом Фиске—Суббароу (с. 34).

К исследуемому раствору, содержащему 0,2—2 мкмоль фосфата, приливают дистиллированную воду до 4,3 мл, добавляют 0,5 мл молибденового реактива и 0,2 мл основного раствора эйконогена. Одновременно ставят контрольные пробы с дистиллированной водой (4,3 мл), которые обрабатывают, как указано выше. Содержимое всех пробирок перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин. Затем пробы тотчас же фотометрируют при 625—650 нм. При более длительном времени выдерживания с молибденовым реактивом происходит гидролиз легкогидролизуемых фосфорных соединений. Содержание фосфата в исследуемом растворе рассчитывают по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика берут несколько проб с различными количествами стандартного раствора (от 0,2 до 2 мкмоль фосфата), которые обрабатывают, как указано выше.

МЕТОД САМНЕРА

Метод позволяет определить от 0,05 до 0,5 мкмоль неорганического фосфата в пробе. В качестве восстановителя используется сульфат железа.

Реактивы:

1. $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ — 6,6%-ный раствор.
2. H_2SO_4 — 7,5 н. раствор.
3. Раствор сульфата железа — 1 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 10 мл H_2O и добавляют 0,2 мл 7,5 н. раствора H_2SO_4 . Раствор готовят непосредственно перед употреблением.
4. Стандартный раствор фосфата (KH_2PO_4) , содержащий 0,5 мкмоль фосфата в 1 мл.

К исследуемому раствору, содержащему 0,05—0,5 мкмоль фосфата, приливают дистиллированную воду до 3,6 мл, добавляют 0,5 мл 6,6%-ного раствора молибдата аммония, 0,5 мл 7,5 н. раствора H_2SO_4 и 0,4 мл раствора сульфата железа. Пробы перемешивают, оставляют при комнатной температуре на 40 мин, после чего фотометрируют при 625 нм. Так же обрабатывают пробы стандартного ряда.

МЕТОД РАТБУНА И БЕТЛАХ

Метод позволяет определить от 0,02 до 0,1 мкмоль неорганического фосфата в пробе. В качестве восстановителя используется хлористое олово. Проведение реакции в буферном растворе при pH 3,4 и введение в реакционную среду формальдегида позволяют определять неорганический фосфат в присутствии АТФ и веществ, имеющих сульфгидрильные группы. Чтобы уменьшить возможность гидролиза лабильных фосфорных эфиров, рекомендуется добавлять в буферную среду этанол до конечной концентрации 10% в измеряемых пробах.

Реактивы:

1. $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ — 2%-ный раствор.
2. Натрий-ацетатный буфер — 3 М раствор, pH 4,3, содержащий 3,7% формальдегида.
3. Хлористое олово — 6,75 мМ свежеприготовленный раствор (15 мг SnCl_2 растворяют в 0,04—0,05 мл ледяной уксусной кислоты, объем раствора доводят водой до 10 мл).
4. Стандартный раствор фосфата (KH_2PO_4) , содержащий 0,1 мкмоль фосфата в 1 мл.

К исследуемому раствору, содержащему 0,02—0,1 мкмоль неорганического фосфата, приливают дистиллированную воду до 1,6 мл, прибавляют 1,1 мл 3 М Na-ацетатного буфера, pH 4,3, содержащего 3,7% формальдегида. К каждой пробе последовательно с интервалом 1—1,5 мин добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и сразу же после интенсивного перемешивания 0,2 мл 6,75 мМ раствора хлористого олова. Окраска развивается в течение 15 мин при 20°С. Пробы фотометрируют при 660 нм. При добавлении в буферную среду этанола окраска развивается до постоянных значений через 45 с. Так же обрабатывают пробы стандартного ряда.

Метод Ратбуна и Бетлах в модификации позволяет проводить определение неорганического фосфата в присутствии белка, если его содержание в измеряемых пробах не превышает 50 мкг. В этом случае к 1 мл исследуемого раствора прибавляют 1 мл 3 М Na-ацетатного буфера, pH 4,3, содержащего 3% формальдегида. Затем добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и 0,1 мл 13,5 мМ раствора хлористого олова (15 мг SnCl_2 растворяют в 4—5 каплях ледяной

CH_3COOH и доводят объем водой до 5 мл). Окраска развивается в течение 15 мин при 20°C .

МЕТОД БЕНЦИНИ

Метод позволяет определить от 0,02 до 0,16; 0,32 или 0,6 мкмоль неорганического фосфата в пробе в зависимости от прибора, используемого при фотометрировании. Основан на измерении интенсивности поглощения света при 350 нм комплексом, образованным фосфатом и молибдатом в присутствии двухвалентного иона цинка. Коэффициент молярного поглощения при 350 нм равен $7,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Реакцию образования комплекса проводят при pH 5,0, что дает возможность определить неорганический фосфат в присутствии лабильных фосфорных соединений. Метод отличается быстротой выполнения.

Реактивы (готовят на бидистиллированной воде):

1. HCl — 6 н. раствор.
2. Молибденовый реактив — 15 мМ раствор $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, приготовленный на 100 мМ растворе ацетата цинка; pH полученного раствора доводят до 5,0 6 н. раствором HCl . Реактив хранят при комнатной температуре в защищенном от прямого солнечного света месте.
3. Стандартный раствор фосфата (KH_2PO_4), содержащий 0,4 мкмоль фосфата в 1 мл или 1 мкмоль фосфата в 1 мл.

К раствору, содержащему от 0,02 до 0,16 мкмоль неорганического фосфата, приливают бидистиллированную воду до 0,4 мл, добавляют 1,2 мл молибденового реактива, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 1 мин. Фотометрируют на приборе «Спекол» при 350 нм в кюветах с расстоянием между рабочими гранями, равным 1 см ($l=1 \text{ см}$). Содержание фосфата в исследуемом растворе рассчитывают по калибровочному графику, построенному с использованием стандартного раствора фосфата, содержащего 0,4 мкмоль в 1 мл.

При работе на спектрофотометре (кювета: $l=1 \text{ см}$, $V=3 \text{ мл}$) объем фотометрируемых проб и содержание в них фосфата удваивают, оставляя без изменения соотношение объемов раствора фосфата и молибденового реактива, равное 1:3. В этом случае определяют до 0,32 мкмоль фосфата в пробе.

При проведении определения на ФЭКе к раствору, содержащему от 0,05 до 0,6 мкмоль фосфата, приливают бидистиллированную воду до 0,6 мл, добавляют 1,8 мл молибденового реактива. Через 1 мин фотометрируют при 340 или 364 нм в кюветах с $l=0,5 \text{ см}$. Для построения калибровочного графика используют стандартный раствор, содержащий 1 мкмоль фосфата в 1 мл.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАБИЛЬНЫХ ФОСФОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Лабильные фосфорные соединения неустойчивы в кислой среде и уже при комнатной температуре расщепляются с образованием неорганического фосфата, молибденовокислый аммоний резко ускоряет этот процесс. К таким соединениям относят все гуанидинфосфаты (креатинфосфат, аргининфосфат и др.), фосфорилированные производные

имидазола, ацилфосфаты. При определении этих соединений из исследуемого раствора предварительно удаляют неорганический фосфат.

Фосфорная кислота в слабощелочной среде при избытке аммиака с ионами Mg^{2+} дает практически нерастворимый осадок аммониево-магниево-соли фосфорной кислоты:



Осаждение неорганического фосфата проводят магниальной смесью. Магниальный фильтрат используют для определения лабильного фосфата.

Реактивы:

1. Магниальная смесь — 20 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ и 40 г NH_4Cl растворяют в 200 мл воды и добавляют 20 мл концентрированного аммиака.
2. Фенолфталеин — 0,5%-ный спиртовой раствор.
3. КОН — 10%-ный раствор.
4. CCl_3COOH — 5 %-ный раствор или $HClO_4$ — 5 %-ный раствор.
5. Реактивы для определения неорганического фосфата методом Фiske—Суббароу (с. 34).

Осаждение белков из исследуемого раствора проводят на холоде равным объемом 5%-ного раствора CCl_3COOH (или $HClO_4$). Осадок белка сразу удаляют фильтрованием или центрифугированием. Из безбелкового раствора быстро отбирают пробу и вносят в 1,5-кратный объем магниальной смеси, предварительно налитой в пробирки, стоящие во льду. Проверяют реакцию среды, добавляя в пробы по капле фенолфталеина. Реакция среды должна быть щелочной (розовое окрашивание с фенолфталеином). После тщательного перемешивания пробирки оставляют во льду на 30—40 мин, периодически их встряхивая. Образовавшийся осадок аммониевомагниево-соли фосфорной кислоты удаляют фильтрованием.

Из магниального фильтрата отбирают аликвоту, учитывая чувствительность колориметрического метода, пробу нейтрализуют 0,2 н. HCl , добавляют молибденовый реактив (1,5 мл) и рабочий раствор эйконогена (1 мл). Объем пробы доводят до 5 мл. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при 37°C не менее чем на 30 мин. Затем пробы охлаждают и фотометрируют. По калибровочному графику рассчитывают содержание лабильного фосфата.

10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОТРИОЗ (ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТА И ДИОКСИАЦЕТОНФОСФАТА)

Фосфотриозы (щелочнолабильные соединения) в 1 н. растворе щелочи уже при комнатной температуре распадаются с отщеплением неорганического фосфата. Таким образом, количество образовавшегося при щелочном гидролизе фосфата соответствует количеству фосфотриоз.

Реактивы:

1. Реактивы для определения неорганического фосфата (с. 34).
2. КОН или NaOH — 2 н. раствор.
3. HCl или H_2SO_4 — 2 н. раствор.

Для определения фосфотриоз берут 2 серии пробирок. В одну серию (опытную) отбирают заранее рассчитанное количество безбелкового фильтрата, например 0,75 мл, добавляют равное количество 2 н. раствора щелочи, т. е. также 0,75 мл, и все тщательно перемешивают. Пробирки оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем в них добавляют по 0,75 мл 2 н. раствора кислоты и по 0,25 мл воды. В другую (контрольную) серию пробирок вначале наливают по 0,75 мл 2 н. щелочи, по 0,75 мл кислоты и только после этого по 0,75 мл безбелкового фильтрата и 0,25 мл воды. В пробирки обеих серий приливают по 1,5 мл молибденового реактива и 1,0 мл раствора эйконогена, все хорошо перемешивают, оставляют пробы при комнатной температуре и через 30 мин фотометрируют.

По разности в количестве неорганического фосфата в первой и второй серии проб рассчитывают содержание фосфотриоз.

11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗО-1-ФОСФАТА (ЛЕГКОГИДРОЛИЗУЕМЫХ В КИСЛОТАХ ФОСФОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ)

Глюкозо-1-фосфат принадлежит к легкогидролизуемым в кислотах фосфорным соединениям. При нагревании в кипящей водяной бане в течение 10 мин в 1 н. растворе сильной кислоты он полностью расщепляется с образованием неорганического фосфата. Такими же свойствами обладают АТФ (отщепляются две частицы фосфорной кислоты) и АДФ (отщепляется одна частица фосфата). В отсутствие АТФ и АДФ глюкозо-1-фосфат определяют по разности количества неорганического фосфата, определяемого в пробах после 10-минутного кислотного гидролиза *a* и в пробах без гидролиза *b*. Если в растворе присутствуют АТФ или АДФ, их необходимо предварительно удалить в виде бариевых солей. Определение неорганического фосфата лучше проводить, используя модификацию метода по Херсу (с. 35).

Реактивы:

1. Реактивы для определения фосфорной кислоты (с. 34).
2. HCl — 2 н. раствор.
3. NaOH — 2 н. раствор.
4. Фенолфталеин — 0,5%-ный спиртовой раствор.
5. $\text{Ba}(\text{OH})_2$.
6. H_2SO_4 — 2 н. раствор.

К безбелковому раствору добавляют равный объем 2 н. соляной кислоты, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем пробы охлаждают, добавляют 2 н. раствор щелочи в количестве, равном добавленной кислоте, и проводят определение неорганического фосфата. Параллельно проводят определение неорганического фосфата *b* (с. 35). По разности ($a-b$) рассчитывают количество фосфата глюкозо-1-фосфата в исследуемой пробе.

Если в исследуемом растворе содержатся АТФ и АДФ, их предварительно удаляют в виде бариевых солей: отбирают исследуемый раствор в центрифужную пробирку, добавляют туда каплю фенолфталеина и при тщательном помешивании вносят небольшими порциями хо-

рошо растертый порошок гидроокиси бария до появления явно выраженной розовой окраски раствора. Осадок бариевых солей АТФ, АДФ, а также неорганического фосфата удаляют центрифугированием и в центрифугате определяют глюкозо-1-фосфат. Для этого отбирают определенное количество, например 1 мл, в центрифужную пробирку, добавляют 1 мл 2 н. H_2SO_4 и ставят в кипящую водяную баню на 10 мин. Осадок сернокислого бария удаляют центрифугированием, центрифугат сливают в мерную пробирку, осадок промывают 2—3 раза слегка подкисленной водой, промывные воды присоединяют к основному центрифугату, нейтрализуют щелочью и определяют фосфат.

12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ФОСФАТУ

Определение глюкозо-6-фосфата может быть проведено по нарастанию неорганического фосфата после щелочного гидролиза. При нагревании в 0,2 н. растворе щелочи в кипящей водяной бане за 10 мин достигается максимум гидролиза. При этом происходит гидролиз и других гексозофосфатов: глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат и фруктозодифосфат расщепляются на 65%. Глюкозо-1-фосфат и глицерофосфат в этих условиях практически не подвергаются гидролизу.

Реактивы:

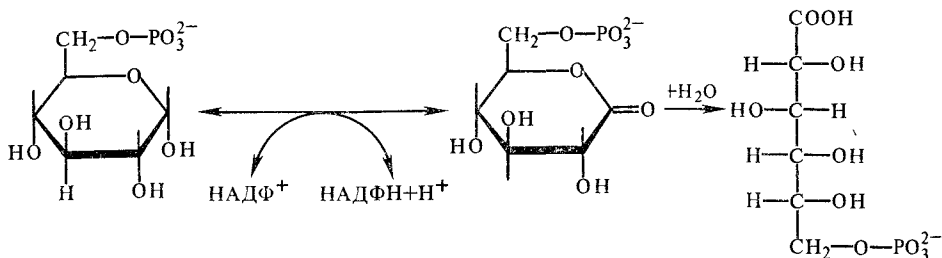
1. Реактивы для определения фосфорной кислоты (с. 34).
2. NaOH — 0,4 н. раствор.
3. HCl — 1,0 н. раствор.
4. Фенолфталеин — 0,5% -ный спиртовой раствор.

К исследуемому нейтральному раствору добавляют равный объем 0,4 н. раствора щелочи, перемешивают и ставят пробирку в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем пробы нейтрализуют соляной кислотой до бледно-розовой окраски на фенолфталеин и проводят колориметрическое определение неорганического фосфата. Если одновременно в растворе содержится фруктозо-6-фосфат, последний определяют по фруктозе, а количество глюкозо-6-фосфата оценивают как разность между количеством фосфата после щелочного гидролиза и фосфата фруктозо-6-фосфата, рассчитанного по количеству определенной фруктозы. Если в исследуемом растворе содержится фруктозодифосфат, то последний предварительно осаждают в виде бариевой соли, которая в отличие от бариевых солей гексозомонофосфатов не растворима в щелочном растворе. Удаление из раствора фруктозодифосфата в виде бариевой соли проводят так же, как и удаление АТФ и АДФ (см. определение глюкозо-1-фосфата).

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Метод основан на энзиматическом окислении глюкозо-6-фосфата в глюконолактон-6-фосфат ферментом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.49) при одновременном восстановлении НАДФ^+ в НАДФН .

Глюконолактон-6-фосфат в водной среде переходит в фосфоглюконовую кислоту:



О количестве глюкозо-6-фосфата судят по количеству образовавшегося НАДФН, измеряя оптическую плотность при 340 нм (см. с. 7).

Реактивы:

1. Глицил-глициновый буфер — 0,04 М раствор, рН 7,4.
2. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 12 мМ раствор, рН 7,4.
3. НАДФ⁺ — 7,8 мМ раствор, рН 6,5. В холодильнике может храниться несколько дней. В процессе работы должен находиться в ледяной бане.
4. Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа — 18 Е/мл¹⁷ (коммерческий препарат). В процессе работы хранится в ледяной бане.
5. Раствор динатриевой или калиевой соли глюкозо-6-фосфата (концентрацию рассчитывают по формуле на с. 7).

В кювету спектрофотометра помещают 2,0 мл глицил-глицинового буфера, 0,75 мл хлористого магния, 0,1 мл НАДФ и 0,1 мл исследуемого раствора. Перемешивают и измеряют оптическую плотность при 340 нм относительно контрольной кюветы, содержащей вместо исследуемого раствора 0,1 мл бидистиллированной воды. Затем в обе кюветы добавляют по 0,05 мл раствора фермента. Пробы быстро перемешивают и определяют увеличение оптической плотности до полного прекращения реакции. Количественное содержание глюкозо-6-фосфата рассчитывают по формуле (с. 7).

13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА

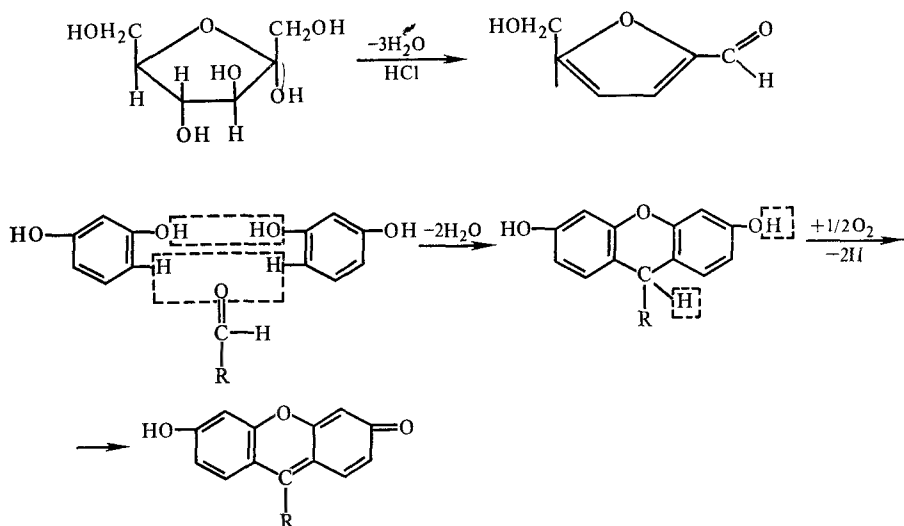
Определение фруктозо-1,6-дифосфата может быть проведено по фосфату после 3-часового гидролиза при 100°C в 1 н. растворе HCl или после гидролиза при 100°C в течение 10 мин в 0,2 н. растворе NaOH (с. 496). Определение фруктозодифосфата может быть проведено также по фруктозе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ФРУКТОЗЕ

Определение основано на цветной реакции Селиванова. При нагревании раствора фруктозы или ее эфиров с крепким раствором соляной

¹⁷ Можно использовать более разведенный препарат фермента при условии, что реакция будет завершена через 5 мин. После окончания реакции оптическая плотность реакционной смеси не должна изменяться.

кислоты происходит образование оксиметилфурфурола, который с резорцином дает розовое окрашивание.



Окраска, образующаяся с фруктозофосфатом, менее интенсивна, чем с фруктозой. Интенсивность окраски с фруктозодифосфатом составляет только 52,5% интенсивности окраски свободной фруктозы, а с фруктозо-6-фосфатом — 60,5%, если проводить определение по *данной прописи*. Метод чувствителен в пределах от 0,05 до 0,7 мкмоль фруктозы в пробе.

Реактивы:

1. Резорцин — 0,1%-ный раствор на 95%-ном спирте.
2. HCl — 30%-ный раствор (уд. вес. 1,15).
3. Фруктоза — стандартный раствор, содержащий в 1 мл 1 мкмоль фруктозы, готовят на 1 н. растворе HCl.

К 1 мл исследуемого раствора, не содержащего белка, приливают 1 мл раствора резорцина и 3 мл 30%-ного раствора соляной кислоты (соляную кислоту берут автоматической пипеткой или пипеткой с грушей). Все тщательно перемешивают и ставят пробы в водяной термостат при 80°C на 8 мин. Одновременно в тех же условиях проводят определение с различными количествами стандартного раствора фруктозы для построения калибровочного графика. Необходимо следить за равномерным нагреванием проб в термостате (неравномерное нагревание является одним из источников погрешности определения). Пробы вынимают из термостата, охлаждают, помещая в холодную воду, и фотометрируют при 490 нм.

Для вычисления количества фруктозо-1,6-дифосфата найденную по калибровочному графику величину фруктозы умножают на коэффициент 1,9 ($1,9 = 100 : 52,5$). В качестве стандартного раствора можно пользоваться также раствором фруктозо-1,6-дифосфата, который готовят на дистиллированной воде, добавляя в качестве антисептика хлороформ. Если в качестве стандартного раствора используют раствор

фруктозодифосфата, то при расчете коэффициент не вводят. Однако стандартным раствором фруктозо-1,6-дифосфата пользуются редко, так как чистота коммерческих препаратов его, как правило, меньше 100%.

АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ БАРИЕВОЙ СОЛИ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА

Осваивая методы определения фруктозо-1,6-дифосфата, полезно определить чистоту препарата его бариевой соли. Навеску, соответствующую 30 мкмоль, растворяют в 5 мл 0,1 н. раствора HCl . 1 мл раствора отбирают для определения фруктозо-1,6-дифосфата по фруктозе. Оставшиеся 4 мл солянокислого раствора бариевой соли фруктозодифосфата используют для получения натриевой соли, хорошо растворимой в воде (см. ниже). Раствор натриевой соли фруктозо-1,6-дифосфата нейтрализуют, доводят водой до 15 мл. В полученном растворе определяют содержание фруктозо-1,6-дифосфата по фруктозе и по фосфату в микромолях, рассчитывают чистоту препарата по фруктозе и по фосфату, сопоставляют данные. Определяют процент потери фруктозо-1,6-дифосфата при переводе бариевой соли в натриевую.

ПЕРЕВОД БАРИЕВОЙ СОЛИ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА В НАТРИЕВУЮ

Натриевые соли гексозофосфатов (фруктозо-1,6-дифосфата, фруктозо-6-фосфата, глюкозо-6-фосфата), фосфоглицериновой кислоты готовят из их бариевых солей, удаляя барий в виде сернокислого бария или с помощью ионообменной смолы. Для этой цели удобно пользоваться катионитом КУ-2 или Дауэкс-50.

Реактивы:

1. Na_2SO_4 — 10%-ный раствор.
2. HCl — 0,1 н. и 4 н. растворы.
3. NaOH — 1 н. раствор.
4. Катиониты (Дауэкс-50; КУ-2 и др.).

Обработка ионообменной смолы. Коммерческий препарат смолы перемешивают с 5—10 объемами 4 н. раствора HCl в течение 20 мин, отсасывают на воронке Бюхнера и промывают дистиллированной водой до тех пор, пока рН фильтрата не станет равным 5—6. Осадок смолы переносят с фильтрата в стакан, заливают 5 объемами 1 н. раствора NaOH , перемешивают в течение 20 мин, отсасывают на воронке Бюхнера и промывают дистиллированной водой, как указано выше. Смолу хранят под слоем дистиллированной воды.

Перевод бариевой соли с помощью ионообменной смолы. Навеску бариевой соли гексозофосфата помещают в центрифужную пробирку, содержащую небольшое количество суспензии катионита, и встряхивают. По мере адсорбции ионов бария происходит исчезновение муты. Пробирку оставляют на 10 мин, время от времени встряхивая, затем центрифугируют. Центрифугат сливают в мерную пробирку, осадок смолы промывают на центрифуге, промывные воды присоединяют к основному центрифугату, и раствор доводят до нужного объема.

Удаление бария в виде BaSO_4 . Навеску бариевой соли гексозофосфата помещают в центрифужную пробирку, растворяют в 1—2 мл 0,1 н. HCl , добавляют 10%-ный раствор Na_2SO_4 , проверяют полноту осаждения и осадок сернокислого бария удаляют центрифугированием. Предварительно рассчитывают примерное количество Na_2SO_4 , которое

необходимо для удаления Ba^{2+} во взятой навеске. Центрифугат сливают в мерную пробирку. Осадок 3 раза промывают небольшим количеством воды (1,0—1,5 мл) с добавлением 1 капли 10%-ного раствора Na_2SO_4 . Объединенный центрифугат нейтрализуют и доводят водой до нужного объема.

14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗО-6-ФОСФАТА

Определение фруктозо-6-фосфата может быть проведено по фосфату после гидролиза при 100°C в течение 70 мин в 1 н. растворе HCl или после гидролиза в течение 10 мин в 0,2 н. растворе NaOH (с. 496). Определение фруктозо-6-фосфата может быть проведено также по фруктозе.

Определение фруктозо-6-фосфата по фруктозе проводят совершенно так же, как и определение фруктозодифосфата (с. 41), но для расчета его количества величину фруктозы, найденную по калибровочному графику, умножают на коэффициент 1,65, если в качестве стандарта была использована фруктоза ($1,65 = 100 : 60,5$). Если в качестве стандарта используют раствор фруктозо-6-фосфата, то при расчете коэффициент не вводят.

15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ФОСФОРА

Общим фосфором ($\Phi_{\text{общ}}$) называют весь фосфор, содержащийся в данной пробе, т. е. сумму неорганического фосфата ($\Phi_{\text{н}}$) и фосфора, входящего в состав органических соединений ($\Phi_{\text{орг}}$). Для определения $\Phi_{\text{общ}}$ исследуемый раствор или ткань сжигают (минерализуют), нагревая с концентрированной H_2SO_4 в присутствии различных окислителей (H_2O_2 , KMnO_4). Наиболее широко используют пергидроль (30%-ный раствор перекиси водорода). H_2O_2 при нагревании легко разлагается и не мешает колориметрическому определению фосфата.

Реактивы:

1. H_2SO_4 — концентрированная.
2. NaOH — 0,5 н. и 5 н. растворы.
3. Реактивы для определения фосфора (с. 34).
4. Пергидроль.
5. Фенолфталеин — 0,5%-ный спиртовой раствор.

Минерализация. Количество взятого на минерализацию раствора зависит от содержания в анализируемом фосфорсодержащем органическом соединении фосфата и от чувствительности используемого для определения фосфата метода. При определении неорганического фосфата методом Фiske—Суббароу на минерализацию берут такое количество исследуемого раствора, чтобы в 1 мл полученного после минерализации и нейтрализации раствора содержалось от 0,2 до 1,0 мкмоль фосфата. 1—2 мл взятого на анализ раствора помещают в небольшую колбу для сжигания (колбу Кьельдаля) или жаростойкую пробирку, добавляют 0,3 мл концентрированной серной кислоты и, укрепив колбу (пробирку) слегка наклонно, осторожно нагревают раствор на горелке, песчаной бане или на специальной электрической плитке до тех пор, пока почти полностью выпарится вода и раствор в колбе приобретет бурую окраску (если органического вещества в пробе мало, то побурения можно и не заметить). После этого колбу (пробирку) охлажда-

дают, добавляют 2—3 капли пергидроля и раствор снова нагревают в течение 5—10 мин. Если раствор при этом побуреет, добавляют новую порцию пергидроля. При добавлении пергидроля следят за тем, чтобы он попал в раствор, а не на стенки колбы или пробирки. Нагрев при минерализации не должен быть слишком сильным, нельзя допускать, чтобы тяжелые белые пары H_2SO_4 и окиси серы выходили из колбы, так как вместе с ними может частично увлекаться фосфат. Рекомендуется проводить минерализацию в колбах, прикрытых стеклянными втулками или маленькими воронками, которые вставляют, когда вода почти испарится. Одновременно с анализируемыми пробами минерализацию проводят в контрольной «слепой» пробе, содержащей вместо исследуемого раствора воду. Необходимость контроля обусловлена тем, что используемые при минерализации реактивы могут содержать следы фосфорной, а также кремневой кислоты, присутствие которых может завесить результаты при определении общего фосфора. При расчете содержания фосфата в исследуемом образце учитывают величину оптической плотности «слепой» пробы. Если значение оптической плотности велико, реактивы следует сменить.

Определение фосфора. По окончании минерализации содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу на 25 мл или в мерную пробирку на 10 мл, добавляя небольшими порциями воду и тщательно ополаскивая колбу Кьельдаля. Первую порцию воды в колбу Кьельдаля следует добавить очень осторожно, так как при этом происходит сильное разогревание раствора и создаются условия для гидролиза пирогосфата, который может образоваться в процессе минерализации при длительном нагревании фосфата с концентрированной серной кислотой. В мерную колбу или пробирку, заполненную приблизительно наполовину разбавленным минерализатом, добавляют 1—2 капли фенолфталеина и нейтрализуют кислоту сначала 5 н., а затем 0,5 н. раствором щелочи до слабозеленой окраски, доводят водой до метки и перемешивают. Из каждой колбы (пробирки) отбирают по две параллельные пробы и проводят определение неорганического фосфата (с. 33). При содержании в образце небольших количеств фосфата (до 0,1 мкмоль на пробу) удобно пользоваться методом, предложенным Бартлеттом (с. 48).

16. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ УГЛЕВОДОВ ПОСЛЕ РАЗДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография — метод разделения газов, паров, жидкостей и растворенных веществ на границе двух фаз — подвижной и неподвижной. Хроматография на бумаге (бумажная хроматография) — один из видов распределительной хроматографии. Метод основан на различии коэффициентов распределения разделяемых веществ между двумя мало-смешивающимися растворителями. В качестве носителя неподвижной фазы используют специальную хроматографическую бумагу. Она должна быть химически чистой, однородной по плотности и обеспечивать определенную скорость движения растворителя.

Исследуемое вещество, находящееся в растворе, наносят в виде капель на некотором расстоянии от края (линия старта) на лист хроматографической бумаги. Бумагу помещают в герметически закрытую камеру и погружают край листа, у которого был нанесен исследуемый раствор, в кювету, содержащую органический растворитель (с. 128,

рис. 17, А). Линия старта с нанесенными на нее пробами не должна погружаться в растворитель.

В силу капиллярности органический растворитель будет передвигаться по листу хроматографической бумаги. Нанесенное на бумагу вещество движется с током растворителя. Степень сорбции исследуемого вещества на гидратированных волокнах бумаги (воздушно-сухие листы фильтровальной бумаги в камере, насыщенной парами водонасыщенного органического растворителя, содержат до 20% воды) определяет скорость его передвижения. Вещества, хуже сорбирующиеся на гидратированных волокнах бумаги, будут передвигаться быстрее. После прохождения фронтом растворителя определенного расстояния бумагу высушивают и обрабатывают тем или иным проявителем. Параллельно с опытным раствором на тот же лист бумаги наносят стандартный раствор исследуемого вещества (свидетель), который будет указывать местоположение определяемого вещества. Для идентификации вещества можно также пользоваться величиной R_f , которая является отношением расстояния, пройденного данным веществом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя. Величина R_f зависит от растворителя и качества бумаги. Различают восходящую (растворитель поднимается по бумаге вверх) и нисходящую (растворитель движется по бумаге вниз) хроматографию.

Хроматографическое разделение фосфорных эфиров углеводов (восходящая хроматография)

Фосфорные эфиры углеводов разделяют с помощью бумажной хроматографии в системе пропиловый спирт — муравьиная кислота. Для определения положения фосфорных эфиров углеводов на бумажных хроматограммах используют метод, предложенный Ваде и Морганом. Хроматограмму обрабатывают сначала раствором хлорного железа, в результате чего фосфорные эфиры фиксируют ионы железа Fe^{3+} , затем сульфосалициловой кислотой, образующей окрашенное комплексное соединение только со свободными ионами Fe^{3+} . Таким образом, в местах нахождения фосфорных эфиров образуются белые пятна. Количественный метод сводится к определению фосфора после минерализации элюата, полученного из того места хроматограммы (не проявленной), где было зафиксировано положение эфира углевода.

Реактивы:

1. Хроматографическая бумага.
2. Пропиловый спирт (перегнанный).
3. Муравьиная кислота — 80%-ный раствор.
4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 0,1%-ный раствор на 80%-ном этиловом спирте (свежеприготовленный).
5. Сульфосалициловая кислота — 1%-ный раствор на 80%-ном этиловом спирте (свежеприготовленный).
6. Глюкозо-6-фосфат — натриевая соль.
7. Фруктозо-6-фосфат — натриевая соль.
8. Фруктозо-1,6-дифосфат — бариевая соль (с. 43).
9. Фосфоглицериновая кислота — бариевая соль (с. 43).
10. HCl — 1 н. раствор.
11. H_2SO_4 — 10 н. раствор.
12. $NaOH$ — 1 н. раствор.
13. Молибденовокислый аммоний — 5%-ный раствор.

14. Эйкозиген — основной раствор, приготовление см. на с. 34.
15. Стандартный раствор фосфата $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, содержащий 0,2 мкмоль фосфата в 1 мл.
16. Na_2SO_4 — 10%-ный раствор.
17. Фенолфталеин — 0,5%-ный раствор на этиловом спирте.

Подготовка хроматограммы. Для хроматографии применяется бумага типа «ленинградская медленная», разрезанная на полосы длиной в 40 см в направлении, перпендикулярном направлению волокон. Ширина полос определяется количеством наносимых проб и размером камеры.

На расстоянии 5—7 см от края простым карандашом проводят черту (линия старта), на которой на расстоянии 3 см от краев и с интервалом в 2,5—3 см помечают точки, куда наносят растворы, подлежащие хроматографированию. В каждую точку (диаметр пятна 3—5 мм) в несколько приемов наносят 0,01—0,02 мл раствора, содержащего 0,2—0,3 мкмоль фосфорного эфира углеводов. Для разделения смеси фосфорных эфиров углеводов (фруктозо- и глюкозо-6-фосфата, фруктозодифосфата, фосfogлюконовой кислоты) используют кислый растворитель, содержащий перегнанный пропиловый спирт и 80%-ную муравьиную кислоту в отношении 3:2.

Хроматографическую бумагу с нанесенными на нее пробами сшивают в форме цилиндра (края бумаги не должны заходить друг на друга) и помещают в кювету с растворителем, стоящую на дне хроматографической камеры (см. рис. 17, А, с. 128). Для насыщения камеры растворитель наливают в кювету накануне. Через 16—18 ч после помещения хроматограммы в камеру, когда растворитель будет на уровне 5—10 см от верхнего края бумаги, хроматограмму вынимают, сушат под тягой на воздухе и ставят для повторной разгонки (хорошие результаты получают после четырехразовой разгонки).

Проявление хроматограммы. Высушенную хроматограмму осторожно опрыскивают сначала 0,1%-ным раствором $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, приготовленным на 80%-ном этиловом спирте, подсушивают на воздухе при комнатной температуре и затем опрыскивают 1%-ным раствором сульфосалициловой кислоты. После высушивания ясно видны белые пятна фосфорных эфиров углеводов на розово-лиловом фоне хроматограммы.

Реакция взаимодействия Fe^{3+} с сульфосалициловой кислотой и соответственно образование цветного фона хроматограммы зависят от pH. При pH 1,5—2,5 окраска фона розовая. При более кислой реакции окраски не образуется, при более щелочной — окраска оранжево-желтая и обнаружение пятен на таком фоне затруднено.

На хроматограмме фосфорные эфиры углеводов располагаются в следующем порядке (снизу вверх): фруктозодифосфат, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фосfogлицериновая кислота. Пятна неорганического фосфата располагаются выше пятен фосфорных эфиров углеводов.

Количественное определение. В три точки на хроматограмму наносят исследуемый раствор. В две другие наносят стандартные растворы фосфорных эфиров углеводов. После хроматографического разделения высушенную хроматограмму разрезают так, что на одной половинке находятся: одна точка, в которую был нанесен исследуемый раствор, и точки, куда наносились стандартные растворы. На другой половине — точки, где был исследуемый раствор. Часть хроматограммы со стандартными растворами проявляют, обрабатывая ее хлорным железом и сульфосалициловой кислотой. Сопоставляя две половины хроматограм-

мы — проявленную и непроявленную, находят на непроявленной половине местоположение пятен фосфорных эфиров углеводов. Эти места обводят простым карандашом, затем вырезают, измельчают ножницами, помещают в пробирки, заливают 2 мл 1 н. раствора HCl и оставляют на 20 ч, закрыв пробирки пробками. После этого из элюата отбирают 1—1,5 мл и проводят минерализацию (с. 44). После минерализации определяют фосфат по Бартлетту. Содержимое проб количественно переносят в мерные пробирки, нейтрализуют по фенолфталеину (индикатор добавляют в пробы), добавляют 0,5 мл 10 н. H₂SO₄, 0,2 мл 5%-ного раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена (основного раствора), доводят водой до 5,0 мл и все быстро перемешивают. Пробирки помещают в кипящую водяную баню точно на 7 мин. Параллельно ставят пробы со стандартными растворами фосфата, содержащие от 0,02 до 0,12 мкмоль фосфора в пробе. После охлаждения пробы колориметрируют при 830 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шарло Г. Методы аналитической химии (количественный анализ неорганических соединений). М., 1969.
2. Молибден и вольфрам//Под ред. Ф. Коттон, Дж. Уилкинсон. Современная неорганическая химия. М., 1969. Т. 3. С 356.
3. Городецкий В. К. Энзиматический метод количественного определения глюкозы в крови с помощью отечественного препарата глюкозооксидазы//Современные методы биохимии. М., 1964. Т. 1. С. 311.
4. Seifter S. et al. The Estimation of Glycogen with the Antrone Reagent//Arch. Biochem. 1950. Vol. 25. P. 191.
5. Solling H., Esmann V. A sensitive Method of Glycogen Determination in the Presence of Interfering Substances Utilizing the Filter—Paper Technique//Analyt. Biochem. 1975. Vol. 68. P. 664.
6. Barker J. B., Summerson W. H. The colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material//J. Biol. Chem. 1941. Vol. 138. P. 535.
7. Fiske C. H., Subbarow Y. The colorimetric Determination of Phosphorus//J. Biol. Chem. 1925. Vol. 66. P. 375
8. Roe J. H. A colorimetric Method for the Determination of Fructose in Blood and Urine//J. Biol. Chem. 1934. Vol. 107. P. 15.
9. Wade H. E., Morgan D. M. Detection of Phosphate Esters on Paper Chromatograms//Nature. 1953. Vol. 171. P. 529.
10. Bartlett G. R. Phosphorus Assay in Column Chromatography//J. Biol. Chem. 1959. Vol. 234. P. 466.
11. Rumeckles V. C., Krotkov G. The Separation of Phosphate Esters and other Metabolites by Ionophoresis and Chromatography//Arch. Biochem. Biophys. 1957. Vol. 70. P. 442.
12. Olson J. A. Spectrophotometric Measurement of α -ketoacid semicarbozones//Arch. Biochem. Biophys. 1959. Vol. 85. P. 225.
13. Sumner I. B. A Method for the colorimetric Determination of Phosphorus//Science. 1944. Vol. 100. P. 413.
14. Rathbun W. B., Betlach M. V. Estimation of Enzymatically produced Orthophosphate in the Presence of Cystein and Adenosine triphosphate//Anal. Biochem. 1969. Vol. 28. P. 436.
15. Bencini D. A., Wild J. R., O'Donovan G. A. Linear One—Step Assay for the Determination of Orthophosphate//Anal. Biochem. 1983. Vol. 132.

III. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ

Для выполнения работ, представленных в данном разделе, используют общие приемы, необходимые при проведении биохимического эксперимента.

Работу начинают с подготовки ряда проб, содержащих субстраты и кофакторы реакции в буферной среде определенного состава. Перед добавлением ферментативного препарата все пробы для охлаждения помещают в лед. В каждом эксперименте обязательно присутствуют

контрольные пробы (пробы «до инкубации»), предназначенные для определения исходного содержания субстратов и продуктов реакции, их не инкубируют. Остальные пробы после добавления ферментативного препарата перемешивают и ставят на инкубацию в условиях, указанных в каждой конкретной методике. После инкубации пробы снова помещают в лед, к реакционной смеси добавляют трихлоруксусную или хлорную кислоту до конечной концентрации 2,5%, перемешивают и оставляют на холоде. Через 10 мин осадок денатурированного белка удаляют фильтрованием или центрифугированием. Если закисление реакционной среды нежелательно, ферментативную реакцию останавливают, нагревая пробы в кипящей водяной бане. В полученных безбелковых растворах определяют содержание субстратов и продуктов реакции. Предварительно рассчитывают их примерное возможное количество в каждой пробе. При расчете можно принять, что в пробах, полученных в оптимальных условиях для данной реакции, в процессе инкубации происходит превращение субстрата на 50%. Учитывая возможное содержание исследуемого вещества в пробе, берут несколько аликвот для определения. При необходимости безбелковый раствор разводят дистиллированной водой. Рассчитывают убыль субстрата и прирост продуктов реакции в микромолях на пробу с учетом всех разведений. Результаты оформляют в виде таблицы или графика.

1. АНАЭРОБНЫЙ РАСПАД УГЛЕВОДОВ

Ферментативный анаэробный распад углеводов исследуют при инкубации тканевого гомогената или экстракта с субстратами гликолиза (гликогеном, глюкозой, а также с промежуточными продуктами гликолиза). О процессе судят по приросту конечного продукта анаэробного превращения углеводов — лактата или убыли субстратов. Отдельные этапы изучают при добавлении в инкубационную среду ингибиторов ферментов или удалении диализом кофакторов и коферментов, необходимых для определенных реакций процесса анаэробного превращения углеводов.

Работу проводят с экстрактами мышц, не содержащими митохондрий. При постановке опытов с гомогенатами, а также с экстрактами, содержащими митохондрии, тканевое дыхание исключают цианидом (конечная концентрация цианида — 10^{-3} М) или проводят инкубацию в анаэробных условиях, в атмосфере азота или аргона.

Получение гомогената скелетных мышц крысы. *Среда выделения:* калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, pH 7,6; pH буфера проверяют на потенциометре или с универсальным индикатором буферным методом. Всю посуду перед работой необходимо охладить на льду.

Мышцы спины и задних конечностей декапитированной крысы помещают в стакан с охлажденной средой выделения. Через 10 мин их вынимают по одной на чашку Петри, обсушивают фильтровальной бумагой, очищают от жира и соединительной ткани и тщательно измельчают ножницами в кашицу. Навеску этой массы (3—5 г) берут на техномических весах в фарфоровой чашке, предварительно взвешенной и стоящей во льду, и делят ее на 2—3 части для порционного гомогенизирования. Порцию кашицы переносят в охлажденный стеклянный стакан гомогенизатора Поттера с тефлоновым пестиком, добавляют 5 объемов среды выделения (на 1 г ткани 5 мл), перемешивают стеклянной палочкой и гомогенизируют 1—2 мин. Гомогенат сливают в стакан. Процедуру повторяют со следующими порциями; гомогенаты объединяют.

Для выполнения некоторых работ гомогенизацию заменяют растиранием мышечной кашицы в ступке с кварцевым песком и с 2—3 объемами среды выделения в течение 30 мин. При такой грубой обработке митохондрии разрушаются, однако окислительные процессы и даже окислительное фосфорилирование могут идти за счет обломков митохондрий. К растертой ткани добавляют среду выделения с таким расчетом, чтобы получить 20%-ный гомогенат: 1 мл гомогената должен содержать 200 мг ткани (разведение 1 : 5).

Получение экстракта, содержащего митохондрии. Гомогенат мышц центрифугируют в течение 10 мин при 600 g и температуре 4°C для удаления обломков клеток и ядер. Надосадочную жидкость (экстракт мышц) фильтруют через четыре слоя влажной марли. Экстракт содержит гликолитические ферменты, митохондрии и микросомы. Измеряют рН и доводят его до значения 7,4. До опыта экстракт хранят при низкой температуре. Получение гомогената и экстракта рекомендуется проводить в холодной комнате и использовать в день получения, чтобы сохранить достаточно высокую активность митохондрий.

Получение экстракта, не содержащего митохондрий. Гомогенат мышц центрифугируют 10 мин при 12 000 g—15 000 g и температуре 4°C. Надосадочную жидкость, представляющую собой экстракт мышц, свободный от митохондрий, ядер и обломков клеток, фильтруют через четыре слоя влажной марли. Хранят до опыта в холодильнике. Работать необходимо со свежewedленным экстрактом. Только в крайних случаях, когда работа не может быть выполнена в день получения, экстракт замораживают и в таком виде хранят. Предварительно измеряют рН, доводят его до значения 7,4.

АНАЭРОБНЫЙ РАСПАД ГЛИКОГЕНА (ГЛИКОГЕНОЛИЗ)

Гликоген — основной субстрат анаэробного распада углеводов в скелетной мускулатуре. В задаче предлагается исследовать влияние добавления АДФ на интенсивность гликогенолиза. Об интенсивности гликогенолиза судят по убыли гликогена и по образованию молочной кислоты.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, рН 7,4.
2. Гликоген — 1%-ный раствор.
3. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,03 М раствор.
4. АДФ — 0,012 М раствор.
5. $НАД^+$ — 0,006 М раствор.
6. Трихлоруксусная кислота (CCl_3COOH) — 5%-ный раствор или хлорная кислота ($HClO_4$) — 0,5 н. раствор.
7. КОН — 5 н. и 30%-ный раствор.
8. Реактивы для определения гликогена с антроном (с. 23).
9. Реактивы для определения молочной кислоты с *n*-оксидифенилом (с. 27) или энзиматическим методом с лактатдегидрогеназой (с. 28).

Растворы гликогена, $НАД^+$ и АДФ готовят на 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4.

Экстракт мышц без митохондрий (с 50) перед опытом разводят 0,05 М калий-фосфатным буфером (рН 7,4) в 2 раза. При инкубации гликогена с экстрактом в качестве кофактора добавляют $НАД^+$.

Схема проведения опыта

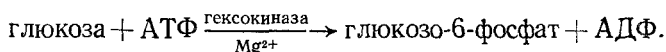
№ пробы	Состав пробы, мл						Время инкубации, мин
	гликоген	MgCl ₂	буфер рН 7,4	НАД ⁺	АДФ	10% ный экстракт	
1,2	0,5	0,2	0,3	0,5	0,5	1,0	—
3,4	0,5	0,2	0,8	0,5	—	1,0	30
5,6	0,5	0,2	0,3	0,5	0,5	1,0	30

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») трихлоруксусную кислоту (3 мл 5%-ного раствора) вносят перед добавлением тканевого экстракта.

Пробы 3—6 после добавления экстракта ставят в водяной термостат при 37°C на инкубацию. После 30 мин инкубации их помещают в лед и приливают равный объем (3 мл) CCl₃COOH. Осадок белка удаляют. В безбелковом растворе каждой пробы определяют содержание гликогена и молочной кислоты с *n*-оксидифенилом. При определении молочной кислоты энзиматическим методом (с. 27) белки осаждают равным объемом 0,5 н. раствора хлорной кислоты. Из безбелкового раствора хлорную кислоту удаляют в виде перхлората калия (с. 29). Полученный раствор используют для определения молочной кислоты и гликогена.

АНАЭРОБНЫЙ РАСПАД ГЛЮКОЗЫ (ГЛИКОЛИЗ)

Анаэробный процесс превращения глюкозы начинается с реакции образования глюкозо-6-фосфата, катализируемой ферментом гексокиназой (КФ 2.7.1.1.):



Добавляя в инкубационную среду НАД⁺-акцептор водорода, можно исследовать его влияние на процесс гликолиза. Об интенсивности гликолиза судят по убыли глюкозы и приросту молочной кислоты. Предлагается сравнить интенсивность гликолиза с добавлением НАД⁺ и без НАД⁺.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, рН 7,4.
2. Глюкоза — 0,03 М раствор, приготовлен на 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4.
3. АТФ — 0,048 М раствор, приготовлен на 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4.
4. НАД⁺ — 0,006 М раствор, рН 6,5.
5. MgCl₂·6H₂O — 0,150 М раствор.
6. CCl₃COOH — 5%-ный раствор или HClO₄ — 0,5 н. раствор.
7. ZnSO₄·7H₂O — 5%-ный раствор.
8. NaOH — 0,3 н. раствор.
9. Реактивы для определения глюкозы с глюкозооксидазой (с. 19).
10. Реактивы для определения молочной кислоты с *n*-оксидифенилом (с. 27) или энзиматическим методом (с. 28).

Экстракт мышц без митохондрий (с. 50) перед опытом разбавляют 0,05 М калий-фосфатным буфером (рН 7,4) в 2 раза.

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав пробы, мл							Время инкубации, мин
	глюкоза	MgCl ₂	АТФ	НАД ⁺	фосфатный буфер	вода	10%ый экстракт ткани	
1, 2	0,5	0,2	0,5	—	0,3	0,5	1,0	—
3, 4	0,5	0,2	0,5	—	0,3	0,5	1,0	30
5, 6	0,5	0,2	0,5	0,5	0,3	—	1,0	30

При заполнении проб пробирки ставят в лед. Тканевый экстракт добавляют в пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации»). После добавления экстракта и перемешивания часть реакционной смеси быстро отбирают для определения глюкозы и молочной кислоты в заранее приготовленные пробирки с соответствующими осадителями белков: для определения глюкозы с глюкозооксидазой по 0,5 мл раствора из каждой пробы переносят в пробирки, содержащие 2,5 мл H₂O, 2 мл 5%-го раствора сернокислого цинка и 1 мл 0,3 н. раствора NaOH, а для определения молочной кислоты по 2 мл исследуемого раствора переносят в пробирки, содержащие 2 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты или 2 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты. После этого экстракт ткани добавляют в пробы 3—6, пробирки ставят в водяной термостат при 37°C. После инкубации пробы обрабатывают, как описано выше (для осаждения белков). Для определения глюкозы из проб 3—6 отбирают по 1 мл раствора и переносят в пробирки, содержащие 2 мл H₂O, 2 мл 5%-ного раствора сернокислого цинка и 1 мл 0,3 н. раствора NaOH. Для определения молочной кислоты из каждой пробы отбирают по 1,5 мл раствора и вносят в пробирки, содержащие по 1,5 мл 5%-ного раствора CCl₃COOH или 1,5 мл 0,5 н. раствора HClO₄. В безбелковом растворе определяют содержание глюкозы и молочной кислоты.

Количество глюкозы в опытных пробах рассчитывают по калибровочному графику. Ввиду того что сернокислый цинк и щелочь частично ингибируют глюкозооксидазу, пробы со стандартным раствором глюкозы обрабатывают так же, как и опытные. Для построения калибровочного графика готовят ряд пробирок, содержащих от 300 до 1200 мкг глюкозы (стандартного раствора). Объем проб доводят дистиллированной водой до 3 мл, в контрольную пробу (без глюкозы) вносят 3 мл дистиллированной воды. Затем в каждую пробу добавляют по 2 мл 5%-ного раствора ZnSO₄·7H₂O и по 1 мл 0,3 н. раствора NaOH. Осадок гидроксида цинка удаляют центрифугированием или фильтрованием. Из каждой пробы отбирают по 0,5 мл раствора в чистые и сухие пробирки, приливают по 0,5 мл дистиллированной воды и по 3 мл «рабочего реактива», перемешивают и фотометрируют развившуюся синюю окраску при 630 нм. Предварительно определяют время, необходимое для развития максимальной окраски (с. 20).

ГЛИКОЛИЗ В ПРИСУТСТВИИ ЙОДАЦЕТАТА

Центральной реакцией анаэробного превращения углеводов является реакция окисления глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-дифосfogлицериновую кислоту, которую катализирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12). Дегидрогеназу ингибируют алкилирующие агенты, например йодацетат, который необратимо связывает SH-груп-

пы фермента. В присутствии йодацетата (конечная концентрация 1×10^{-3} М) процесс гликолиза тормозится на стадии образования триозофосфатов. В инкубационной среде происходит накопление фруктозодифосфата, так как равновесие альдолазной реакции сдвинуто в сторону образования фруктозо-1,6-дифосфата.

В задаче предлагается исследовать превращение гликогена экстрактами мышц, не содержащими митохондрий, в присутствии йодацетата и без него. Об интенсивности процесса судят по убыли гликогена и образованию фруктозо-1,6-дифосфата и молочной кислоты.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, pH 7,4.
2. Гликоген — 1% -ный раствор, приготовлен на калий-фосфатном буфере 0,05 М, pH 7,4.
3. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,03 М раствор.
4. Йодацетат ($CH_2I\text{COOH}$) — 0,01 М раствор, pH 7,4.
5. Хлорная кислота — 0,5 н. раствор.
6. KOH — 5 н. раствор.
7. Реактивы для определения гликогена (с. 23).
8. Реактивы для определения фруктозодифосфата с резорцином (с. 42).
9. Реактивы для определения молочной кислоты с *n*-оксидифенидом (с. 27) или энзиматическим методом (с. 28).

Используют экстракт мышц без митохондрий (с. 50).

Схема проведения опыта

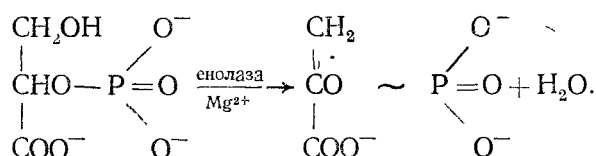
№ пробы	Состав пробы, мл						Время инкубации, мин
	гликоген	$MgCl_2$	H_2O	буфер	йод-ацетат	20%-ый экстракт	
1,2	0,5	0,2	—	1,0	0,3	1,0	—
3,4	0,5	0,2	0,3	1,0	—	1,0	30
5,6	0,5	0,2	—	1,0	0,3	1,0	30

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») добавляют хлорную кислоту (3 мл 0,5 н. раствора) до прибавления экстракта.

Пробы 3—6 после добавления экстракта мышц ставят на инкубацию в водяной термостат при 37°C. После инкубации пробирки помещают в лед и в каждую приливают равный объем хлорной кислоты. Осадок белка удаляют. В безбелковом растворе определяют содержание гликогена, фруктозо-1,6-фосфата и молочной кислоты.

ГЛИКОЛИЗ В ПРИСУТСТВИИ ФТОРИДА

Превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват является второй реакцией гликолиза, в результате которой образуется соединение с макроэргической связью:



Реакцию катализирует фермент фосфопируватгидратаза (енолаза, КФ 4.2.1.11). Фермент ингибируется фторидом (конечная концентрация фторида 0,02 М) особенно в присутствии фосфата. Считают, что ингибирующее влияние оказывает Mg^{2+} -фторфосфатный комплекс. Таким образом, добавление в инкубационную среду фторида прерывает гликолиз на стадии превращения фосfogлицириновых кислот и приводит к накоплению 3-фосfogлицирата. В этих условиях образования скольких-либо заметных количеств молочной кислоты не происходит.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, pH 7,4.
 2. Гликоген — 1%-ный раствор.
 3. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,03 М раствор.
 4. АДФ — 0,012 М раствор.
 5. НАД⁺ — 0,006 М раствор.
 6. NaF — 0,2 М раствор, pH 7,4.
 7. КОН — 5 н. раствор.
 8. Реактивы для определения гликогена (с. 23).
 9. Реактивы для определения фосfogлицириновой кислоты методом бумажной хроматографии (с. 46).
 10. Реактивы для определения молочной кислоты с *n*-оксидифенилом (с. 27).
- Растворы гликогена, АДФ и НАД готовят на 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4.

Используют экстракт мышц без митохондрий (с. 50).

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав пробы, мл							Время инкубации, мин
	гликоген	$MgCl_2$	АДФ	НАД ⁺	H ₂ O	NaF	20% ный экстракт	
1, 2	0,5	0,2	0,5	0,5	0,3	—	1,0	—
3, 4	0,5	0,2	0,5	0,5	0,3	—	1,0	30
5, 6	0,5	0,2	0,5	0,5	—	0,3	1,0	30

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») хлорную кислоту (3 мл 0,5 н. раствора) добавляют перед прибавлением экстракта.

Пробы 3—6 после добавления экстракта инкубируют в водяном термостате при 37° С. После инкубации пробирки помещают в лед и в каждую приливают равный объем хлорной кислоты. Осадок белка удаляют. Так как содержание фосfogлицириновой кислоты определяют методом бумажной хроматографии, безбелковый раствор необходимо нейтрализовать 5 н. раствором КОН и осадок перхлората калия удалить (с. 29). В полученном растворе определяют гликоген, фосfogлицириновую и молочную кислоты.

ВЛИЯНИЕ ФТОРИДА НА ПРЕВРАЩЕНИЕ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА В МОЛОЧНУЮ КИСЛОТУ

Используя экстракт мышц, не содержащий митохондрий, можно наблюдать за превращением как гликогена, так и любого промежуточ-

ного продукта гликогенолиза в молочную кислоту. Фторид является ингибитором енолазы, осуществляющей превращение 2-фосфоглицериновой кислоты в фосфоенолпируват, поэтому в его присутствии молочная кислота образовываться не будет.

В задаче предлагается проследить за убылью фруктозо-1,6-дифосфата и образованием фосфоглицериновой и молочной кислот в процессе инкубации экстрактов мышц в присутствии фторида и без него.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, pH 7,4.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат (натриевая соль) — 0,01 М раствор, pH 7,4.
3. Фтористый натрий (NaF) — 0,6 М раствор, pH 7,4.
4. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1 М раствор.
5. CCl_3COOH — 5%-ный раствор или $HClO_4$ — 0,5 н. раствор.
6. Реактивы для определения фруктозо-1,6-дифосфата по фруктозе (с. 42).
7. Реактивы для определения молочной кислоты с *n*-оксидифенилом (с. 27) или энзиматическим методом (с. 28).
8. Реактивы для определения фосфоглицериновой кислоты методом бумажной хроматографии (с. 46).

Используют экстракт, не содержащий митохондрий (см. с. 50).

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав пробы, мл						Время инкубации, мин
	фруктозо-1,6-дифосфат	$MgCl_2$	H_2O	NaF	буфер pH 7,4	20%-ный экстракт	
1,2	1,0	0,1	0,1	—	0,8	1,0	—
3,4	1,0	0,1	0,1	—	0,8	1,0	20
5,6	1,0	0,1	—	0,1	0,8	1,0	20

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») приливают трихлоруксусную кислоту (3 мл 5%-ный раствор) перед добавлением тканевого экстракта.

После добавления экстракта пробы 3—6 ставят на инкубацию в водяной термостат при 26°С. После инкубации пробирки помещают в лед и в каждую добавляют по 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Денатурировавшие белки удаляют. В безбелковом растворе определяют фруктозо-1,6-дифосфат и молочную кислоту. Если предполагают определять содержание фосфоглицериновой кислоты методом бумажной хроматографии и молочной кислоты энзиматическим методом, белки осаждают хлорной кислотой. Безбелковый фильтрат необходимо нейтрализовать 5 н. раствором КОН и осадок перхлората калия удалить (с. 29). В полученном растворе определяют фруктозо-1,6-дифосфат, фосфоглицериновую и молочную кислоты.

ВЛИЯНИЕ КОФАКТОРОВ НА ПРЕВРАЩЕНИЕ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА В ПРИСУТСТВИИ ФТОРИДА

Превращение фруктозодифосфата под влиянием ферментов, содержащихся в экстракте мышц, в присутствии фторида (ингибитора енолазы) тормозится на стадии образования 2-фосфоглицериновой кисло-

ты. В такой системе можно исследовать влияние НАД⁺ и АДФ на превращение фосfogлицеринового альдегида, образующегося в результате альдолазного расщепления фруктозо-1,6-дифосфата. Ускорение гликолитической оксидоредукции и фосfogлицераткиназной реакции при добавлении НАД⁺ и АДФ приведет к большей убыли фруктозо-1,6-дифосфата в процессе инкубации.

Предлагается сравнить убыль фруктозо-1,6-дифосфата в отсутствие добавок с глубиной его превращения в присутствии указанных кофакторов, добавляемых порознь и совместно.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, рН 7,4.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат (натриевая соль) — 0,02 М раствор, рН 7,4.
3. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1 М раствор.
4. АДФ — 0,01 М раствор.
5. НАД⁺ — 0,006 М раствор.
6. NaF — 0,6 М раствор, рН 7,4.
7. Трихлоруксусная кислота — 5 %-ный раствор.
8. Реактивы для определения фруктозодифосфата по фруктозе (с. 42).

Растворы АДФ и НАД готовят на 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4.

Экстракт мышц без митохондрий (с. 50) перед опытом разводят в два раза 0,05 М калий-фосфатным буфером, рН 7,4. Если экстракт хранился в замороженном виде, его размораживают перед опытом, проверяют рН и вдвое разбавляют буфером.

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав пробы, мл								Время инкубации мин
	фруктозо-1,6 дифосфат	$MgCl_2$	NaF	АДФ	НАД ⁺	H_2O	буфер	10%-ный экстракт	
1,2	0,5	0,1	—	—	—	0,4	1,0	1,0	—
3,4	0,5	0,1	0,1	—	—	0,3	1,0	1,0	20
5,6	0,5	0,1	0,1	—	0,5	0,3	0,5	1,0	20
7,8	0,5	0,1	0,1	0,5	—	0,3	0,5	1,0	20
9,10	0,5	0,1	0,1	0,5	0,5	0,3	—	1,0	20

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») приливают по 3 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты перед добавлением экстракта.

Пробы 3—10 после добавления экстракта ставят в водяной термостат при 26°С на инкубацию. После инкубации их помещают в лед и добавляют по 3 мл трихлоруксусной кислоты. Денатурировавшие белки удаляют. В безбелковом растворе определяют фруктозо-1,6-дифосфат по фруктозе. Рассчитывают убыль фруктозодифосфата в процессе инкубации. Полученные данные представляют в виде диаграммы.

ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА ПРОЦЕСС ГЛИКОЛИЗА (ЭФФЕКТ ПАСТЕРА)

Эффект Пастера — торможение гликолиза дыханием — можно наблюдать при инкубации тканевого экстракта, содержащего митохон-

дрии, с субстратами гликолиза параллельно в атмосфере O_2 и N_2 (или Ar). Об интенсивности гликолиза судят по убыли субстрата и по приросту конечного продукта гликолиза — молочной кислоты. В качестве субстрата гликолиза может быть использован фруктозо-1,6-дифосфат. Обычно работают с мышечной тканью.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, pH 7,4.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат (натриевая соль) — 40 мМ раствор, pH 7,4.
3. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,016 М раствор.
4. Хлорная кислота — 0,5 н. раствор.
5. KOH — 5 н. раствор.
6. Реактивы для определения фруктозо-1,6-дифосфата с резорцином (с. 42).
7. Реактивы для определения молочной кислоты с *n*-оксидифенилом (с. 27) или энзиматическим методом (с. 28).

Используют экстракт мышц, содержащий митохондрии, полученный из 5 г измельченных мышц (с. 50). Для опыта готовят 6 колбочек емкостью 25—30 мл, плотно закрывают резиновыми пробками. В каждую пробку вставлены по две стеклянные трубочки, одна из которых длинная, доходящая почти до дна, другая — короткая, оканчивающаяся сразу под пробкой. Через длинную трубочку газ входит в колбочку, через короткую выходит из нее. Таким образом, с помощью такой системы воздух в колбочках может быть заменен кислородом, азотом или аргоном (рис. 4). Вместо колбочек можно использовать пробирки с такой же системой для пропускания газов.

Перед заполнением реакционной смесью все колбочки ставят в лед. В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») приливают по 4 мл хлорной кислоты перед добавлением экстракта. В пробы 3—6 вносят фруктозо-1,6-дифосфат и $MgCl_2$, закрывают пробками с трубочками. Через пробы 3 и 4 в течение 10 мин пропускают кислород, через пробы 5 и 6 — азот. В пробы 3—6 до-

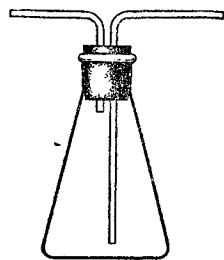


Рис. 4. Колбочка для смены газовой фазы

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав пробы, мл				Время инкубации, мин
	фруктозо 1,6-дифосфат	$MgCl_2$	20% р-р экстракта мышц	газовая среда	
1,2	0,5	0,5	3,0	воздух	—
3,4	0,5	0,5	3,0	O_2	20
5,6	0,5	0,5	3,0	N_2 (или Ar)	20

бавляют по 3 мл экстракта мышц и продолжают пропускать O_2 и N_2 соответственно еще в течение 3—5 мин.

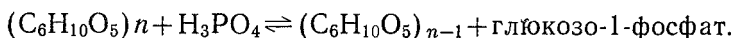
пробки с системой трубочек быстро заменяют на обычные. Ставят все пробы в термостат при 26°С и 20 мин инкубируют при встряхивании. После инкубации пробы помещают в лед и в каждую добавляют по 4 мл хлорной кислоты. Выпавшие в осадок белки удаляют фильтрованием и в фильтрате определяют фруктозо-1,6-дифосфат и молочную кислоту.

При определении молочной кислоты энзиматическим методом безбелковый фильтрат нейтрализуют 5 н. раствором КОН и перхлорат калия удаляют (с. 29). В полученном растворе определяют фруктозодифосфат и молочную кислоту.

2. ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЛИЗА

ПРЕВРАЩЕНИЕ ГЛЮКОЗО-1-ФОСФАТА В ГЛИКОГЕН

Глюкозо-1-фосфат — промежуточный продукт гликолиза. Его образование в результате фосфоролитического отщепления нередуцирующего концевой остатка глюкозы от гликогена катализируется ферментом гликогенфосфорилазой (КФ 2.4.1.1). Реакция обратима:



Фосфорилаза мышечной ткани существует в двух взаимопревращающихся формах: активной — фосфорилаза *a* и неактивной — фосфорилаза *b* (с. 219).

В задаче предлагается проследить за превращением глюкозо-1-фосфата из скелетных и сердечной мышц крысы (кролика) в гликоген, измеряя количество неорганического фосфата, образующегося в процессе инкубации при участии фосфорилазы (обратная реакция). Добавление в реакционную смесь АМФ позволяет определить убыль глюкозо-1-фосфата под влиянием обеих форм фосфорилазы. В пробах без АМФ ферментативное превращение глюкозо-1-фосфата будет осуществляться только фосфорилазой *a*. По разности между приростом неорганического фосфата, освобождающегося в ходе реакции в присутствии и отсутствие АМФ, рассчитывают убыль глюкозо-1-фосфата в результате действия фосфорилазы *b*. Следует учесть, что фосфорилаза *a* в реакционной среде без АМФ проявляет только 70% активности, определяемой в его присутствии. В связи с этим при расчете убыли глюкозо-1-фосфата в пробе с АМФ под влиянием фосфорилазы *b* необходимо величину, полученную для фосфорилазы *a* в пробе без АМФ, пересчитать на 100%.

Получение тканевого экстракта. Только что выделенные из организма (с. 49) скелетные мышцы и сердце помещают в стакан с ледяной средой гомогенизации (раствор № 1). Сердце отмывают от крови. 1—2 г измельченной ткани используют для приготовления гомогената, а затем экстракта, не содержащего митохондрий (с. 50).

Реактивы:

1. ЭДТА — $5 \cdot 10^{-1}$ М раствор, рН 7,4, содержащий NaF $1 \cdot 10^{-1}$ М (раствор № 1).
2. ЭДТА — $5 \cdot 10^{-1}$ М раствор, рН 6,1, содержащий NaF $1 \cdot 10^{-1}$ М (раствор № 2).
3. Гликоген — 2%-ный раствор, приготовлен на растворе № 2.
4. Глюкозо-1-фосфат — $1,2 \cdot 10^{-1}$ М, приготовлен на растворе № 2.
5. АМФ — $1 \cdot 10^{-2}$ М раствор, приготовлен на растворе № 2.

6. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор.
7. Реактивы для определения неорганического фосфата (по методу Херса, см. с. 35).

Непосредственно перед опытом экстракт скелетных мышц раствором № 2 дополнительно разводят в 20 раз. Экстракт из мышцы сердца разводят только в 3 раза. Заполняют пробы, стоящие во льду, по схеме. Последним добавляют экстракт, содержащее пробы быстро перемешивают и помещают в водяной термостат при 30°C. Инкубацию проводят в течение 20 мин.

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав проб, мл				
	глюкозо-1-фосфат	гликоген	АМФ	раствор № 2	экстракт
1,2	0,4	0,4	—	0,2	1,0
3,4	0,4	0,4	0,2	—	1,0
5,6	0,4	—	—	0,6	1,0

По окончании инкубации пробы вынимают из термостата, помещают в лед и приливают равный объем охлажденного 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Осадок белка удаляют центрифугированием, в безбелковом растворе определяют неорганический фосфат.

Пробы 5 и 6 ставят для учета нарастания неорганического фосфата в процессе инкубации за счет возможного фосфатазного расщепления глюкозо-1-фосфата. Количество неорганического фосфата, определенное в этих пробах, вычитают из 1—4 проб. На основании полученных данных можно рассчитать процент превращения глюкозо-1-фосфата в гликоген под влиянием фосфорилазы *a* и фосфорилазы *b* в исследуемых мышцах, выражая прирост неорганического фосфата в микромолях в минуту на 1 г сырого веса ткани.

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА УРОВЕНЬ САХАРА КРОВИ И АКТИВНОСТЬ ФОСФОРИЛАЗЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

В работе предлагается определить содержание сахара в крови и процент превращения глюкозо-1-фосфата в гликоген в мышцах под влиянием фосфорилазы *a* и *b* после введения животному адреналина.

Гормон мозгового вещества надпочечников адреналин является активатором аденилатциклазы — фермента, катализирующего, образование цАМФ. Это вещество активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, что приводит к ускорению фосфоролитического распада гликогена в печени и мышцах.

Подготовка животного. Крысе весом 200—250 г вводят внутрибрюшинно адреналин (коммерческий) из расчета 0,4 мг на 1 кг веса животного. Через 2 ч из яремной вены берут шприцем кровь и выливают ее в пробирку с оксалатом (для предотвращения свертывания). При отсутствии навыков взятия крови из яремной вены кровь собирают в фарфоровую чашку с оксалатом в момент декапитации.

В мышечном экстракте, полученном, как описано ранее (с. 50), исследуют процент превращения глюкозо-1-фосфата в гликоген под влиянием фосфорилазы *a* и *b* (с. 58). В крови определяют содержа-

ние глюкозы глюкозооксидазным методом (с. 18) или методом Хагедорна—Иенсена (с. 21). В качестве контроля используют те же ткани крысы, которой не вводили адреналин, проводя с ними соответствующие определения. Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

ПРЕВРАЩЕНИЕ ГЛЮКОЗО-1-ФОСФАТА В ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ

Фосфоглюкомутаза (КФ 2.7.5.1) катализирует обратимое превращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат. Равновесие реакции сильно смещено в сторону образования глюкозо-6-фосфата и устанавливается, когда около 95% фосфогексоз находится в форме глюкозо-6-фосфата. Фермент относительно термостабилен и не инактивируется при нагревании до 65°C. В задаче предлагается проследить за превращением глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат, используя мышечный экстракт, в котором предварительной термообработкой инактивирована глюкозофосфатизомераза.

Получение препарата фосфоглюкомутазы из мышц. В качестве источника фермента можно использовать мышцы крысы, кролика или голубя. В маленькой фарфоровой чашке взвешивают 15 г мышц (получение см. на с. 49), тщательно измельчают ножницами, переносят в ступку, добавляют двойной объем холодной дистиллированной воды и растирают пестиком до получения однородной массы с добавлением небольшого количества промытого кварцевого песка. Экстрагируют ткань в течение 30 мин. Все процедуры осуществляют на холоде, реактивы и необходимая посуда должна находиться в кювете со льдом.

Мышечный гомогенат центрифугируют 10 мин в центрифуге с охлаждением при 12 000 g. Для инактивации глюкозофосфатизомеразы проводят тепловую обработку. Мутный экстракт из центрифужных пробирок сливают в стеклянный стакан, доводят его pH до 5,0, добавляя по каплям 1 н. CH_3COOH при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Проводят тепловую обработку: стакан с экстрактом помещают в водяную баню, нагретую до 85—90°C, и нагревают экстракт, поддерживая указанную температуру в бане, до тех пор, пока его температура достигнет 65° (экстракт постоянно перемешивают). По окончании тепловой обработки стакан с экстрактом помещают в ледяную баню и охлаждают его до 4°C. Осадок денатурированных белков отделяют центрифугированием или фильтрованием. Центрифугат (фильтрат) хранят в рефрижераторе и используют его как источник фосфоглюкомутазы. Так как ферментативная активность сохраняется в течение нескольких недель, экстракт можно использовать при проведении повторных экспериментов.

Реактивы:

1. Имидазольный буфер — 0,2 М раствор, pH 7,5.
2. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,02 М раствор.
3. Глюкозо-1-фосфат — 0,02 М раствор.
4. Препарат фосфоглюкомутазы, pH 7,5.
5. Реактивы для определения неорганического фосфата (см. с. 34).
6. NaOH — 2,0 и 0,4 н. растворы.
7. HCl — 2,0 и 1,0 н. растворы.

Перед началом работы нужное для постановки опыта количество экстракта разводят в 5 раз дистиллированной водой и доводят pH до

1,0 н. раствором NaOH или KOH (можно капельным методом с универсальным индикатором, если объем экстракта мал). Выпавший в осадок белок следует отфильтровать.

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав пробы, мл					Время инкубации, мин
	буфер	MgSO ₄	экстракт	глюкозо-1-фосфат	инактивированный экстракт	
1	0,4	0,1	—	0,5	1,0	—
2	0,4	0,1	—	0,5	1,0	—
3	0,4	0,1	1,0	0,5	—	30
4	0,4	0,1	1,0	0,5	—	30

В данной задаче ферментативный процесс прекращают, нагревая пробы в кипящей водяной бане. В связи с этим в пробы 1 и 2 («до инкубации») добавляют инактивированный нагреванием экстракт. Инактивацию проводят следующим образом: наливают в пробирку 3 мл экстракта и помещают в кипящую водяную баню на 5 мин, после чего охлаждают во льду. Пробы 3—4 перед добавлением субстрата преинкубируют в присутствии имидазольного буфера и Mg⁺² при комнатной температуре 15 мин для активации фосфоглюкомутазы. В пробы добавляют субстрат и все четыре пробы (1—4) инкубируют 30 мин в водяном термостате при 30°C. По окончании инкубации пробы нагревают в кипящей водяной бане в течение 2 мин и помещают в лед. Во все пробы приливают по 2 мл дистиллированной воды и в случае необходимости фильтруют.

В фильтрате определяют глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат по фосфату (с. 35). Рассчитывают убыль глюкозо-1-фосфата и прирост глюкозо-6-фосфата в процессе инкубации.

Глюкозо-6-фосфат можно определить также энзиматическим методом в системе, содержащей глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и НАДФ (с. 40).

ПРЕВРАЩЕНИЕ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА ВО ФРУКТОЗО-6-ФОСФАТ

Глюкозофосфатизомераза (КФ 5.3.1.9) катализирует обратимое превращение глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата. Равновесие устанавливается при соотношении альдозы к кетозе приблизительно равном 2:1. Для проявления активности фермента не требуется присутствия ионов металлов или каких-либо кофакторов. Реакция изомеризации легко протекает в диализованных экстрактах мышц. Отсутствие АТФ в таких экстрактах делает невозможным дальнейшее превращение фруктозо-6-фосфата под влиянием фосфофруктокиназы. О процессе изомеризации судят по изменению содержания глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата в процессе инкубации.

Приготовление диализованного мышечного экстракта. Все процедуры по извлечению мышц осуществляют на холоде по возможности быстро. Реактивы и посуду предварительно охлаждают на льду. Используют скелетные мышцы крысы и кролика или грудную мышцу — у голубя. Взвешивают 3 г мышечной кашицы (приготовление см. на с. 49) и гомогенизируют с пятикратным объемом холодного 0,5%-ного раствора KCl в течение 2 мин. Гомогенат центрифугируют в центрифуге

те с охлаждением 10 мин при 12 000 g. Надосадочную жидкость помещают в целлофановый мешочек или диализную трубку (рис. 5) и проводят диализ против 0,5%-ного раствора KCl в стакане на 1—2 л в холодной комнате в течение 5—6 ч. Для ускорения диализа рекомендуется несколько раз (3—4) менять раствор KCl в стакане и перемешивать его магнитной мешалкой. В случае необходимости диализ можно продлить до 24 ч. После диализа экстракт хранят в холодильнике при 4° С. Фермент сохраняет активность в течение не-

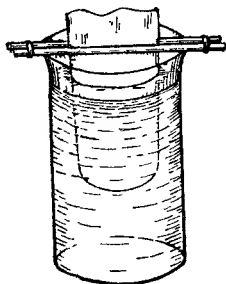


Рис 5. Простейший диализатор

дели. Непосредственно перед опытом экстракт разводят холодным 0,5%-ным раствором KCl в 15—20 раз.

Реактивы:

1. Глициновый буфер — $1,5 \cdot 10^{-1}$ М раствор, pH 9,0.
2. Глюкозо-6-фосфат — $3 \cdot 10^{-2}$ М раствор.
3. KCl — 0,5%-ный раствор.
4. NaOH — 0,4 н. раствор.
5. CCl_3COOH — 5%-ный раствор или 0,5 н. раствор HClO_4 .
6. Реактивы для определения фруктозо-6-фосфата с резорцином (с. 49).
7. Реактивы для определения фосфата (с. 34).

Перед началом работы нужное количество экстракта разводят в 15—20 раз 0,5%-ным раствором KCl. Выпавший осадок денатурировавших белков можно отфильтровать.

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав проб, мл			Время инкубации, мин
	глюкозо-6-фосфат	глициновый буфер	экстракт тк. ии	
1,2	0,5	1,0	1,50	—
3,4	0,5	1,0	1,50	10
5,6	0,5	1,0	1,50	20
7,8	0,5	1,0	1,50	30

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») перед добавлением экстракта приливают по 3 мл 5%-ного раствора CCl_3COOH . Остальные пробы после добавления экстракта инкубируют в водяном термостате при 26°С. По окончании инкубации в пробы 3—8 добавляют по 3 мл 5%-ного раствора CCl_3COOH . В безбелковом фильтрате фруктозо-6-фосфат определяют по фруктозе (с. 41), глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат определяют вместе, по нарастанию фосфата после щелочного гидролиза (с. 40). Трихлоруксусный фильтрат перед проведением

щелочного гидролиза необходимо нейтрализовать. Учитывая количество найденного фруктозо-6-фосфата, рассчитывают содержание глюкозо-6-фосфата в пробах. По убыли глюкозо-6-фосфата рассчитывают процент его изомеризации.

Убыль глюкозо-6-фосфата можно определить и энзиматическим методом, как описано на с. 40. В этом случае белки осаждают хлорной кислотой. Хлорную кислоту удаляют в виде перхлората калия (с. 29).

ПРЕВРАЩЕНИЕ ФРУКТОЗО-6-ФОСФАТА В ГЛЮКОЗО 6-ФОСФАТ

Работы выполняют согласно методике, описанной на с. 61, за исключением того, что в качестве субстрата используют $3 \cdot 10^{-2}$ М раствор фруктозо-6-фосфата. О превращении фруктозо-6-фосфата судят по его убыли и приросту глюкозо-6-фосфата.

ОБРАЗОВАНИЕ ФОСФОТРИОЗ ИЗ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА

Расщепление фруктозо-1,6-дифосфата на две фосфотриозы катализирует альдолаза (КФ 4.1.2.13). При этом образуется глицеральдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат. Альдолаза мышц не требует для проявления ферментативной активности ионов металлов или каких-либо кофакторов. При исследовании превращения фруктозо-1,6-дифосфата в качестве источника альдолазы используют диализованные экстракты мышц. В процессе диализа из экстракта удаляются компоненты адениловой системы НАД и неорганический фосфат, в отсутствие которых становится невозможным дальнейшее превращение глицеральдегид-3-фосфата под влиянием глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Альдолаза относительно термостабильна. Ферментативное расщепление фруктозо-1,6-дифосфата обратимо, положение равновесия с повышением температуры смещается в сторону образования фосфотриоз, константа равновесия при этом возрастает.

В задаче предлагается проследить за превращением фруктозо-1,6-дифосфата в фосфотриозы в процессе инкубации мышечного экстракта и убедиться в ускорении реакции расщепления с повышением температуры.

Получение диализованного экстракта. Измельченные мышцы крысы или кролика (с. 49) заливают двойным объемом холодного 0,5%-ного раствора KCl и растирают ткань в ступке. Диализ проводят против 0,5%-ного раствора KCl не менее 3 часов; раствор KCl в стакане, в котором проводят диализ, меняют 2 раза и перемешивают его для ускорения диализа магнитной мешалкой. В случае необходимости время диализа можно продлить до 24 ч. Диализованный экстракт хранят до опыта в холодильнике.

Реактивы:

1. Глициновый буфер — 0,1 М раствор, рН 9,0.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат (натриевая соль) — 0,02 М раствор.
3. KCl — 0,5%-ный раствор.
4. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор.
5. Реактивы для определения фосфотриоз (с. 38).
6. Реактивы для определения фруктозо-1,6-дифосфата по фруктозе (с. 42).

нужное по расчету количество коммерческого препарата бариевой соли фруктозо-1,6-дифосфата переводят в натриевую (с. 43). Диализованный экстракт перед опытом не разводят.

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав пробы, мл			Температура инкубации	Время инкубации, мин
	фруктозо-1,6-дифосфат	глицино-вый буфер	экстракт ткани		
1	1	2	—	20	15
2	1	1	1	20	5
3	1	1	1	20	15
4	1	1	1	60	5

Заполнение проб проводят следующим образом. Во все пробирки наливают раствор фруктозо-1,6-дифосфата и буфер. Первые три пробирки оставляют при 20°C, а четвертую помещают в термостат при 60°C на 5 мин. Одновременно в тот же термостат помещают небольшое количество приготовленного диализованного экстракта. Большую часть экстракта оставляют при комнатной температуре. Через 5 мин во вторую и третью пробирки добавляют экстракт, стоящий при 20°C, а в четвертую экстракт, стоящий при 60°C. Содержимое пробирок перемешивают и проводят инкубацию по схеме. Затем во все пробы добавляют равный объем 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и осадок белка удаляют центрифугированием или фильтрованием. В безбелковом растворе проводят определение триозофосфатов (в пробах, взятых на анализ, предварительно нейтрализуют трихлоруксусную кислоту) и фруктозо-1,6-дифосфат.

На основании полученных данных рассчитывают кажущуюся константу равновесия, принимая, что концентрации глицеральдегид-3-фосфата и диоксиацетонфосфата равны:

$$K = \frac{[\text{диоксиацетонфосфат}] [\text{глицеральдегид-3-фосфат}]}{[\text{фруктозо-1,6-дифосфат}]}$$

Однако следует принять во внимание, что в диализованном экстракте присутствует высокоактивный фермент — триозофосфат изомераз, катализирующий реакцию изомеризации фосфотриоз. Равновесие этой реакции сильно сдвинуто в сторону фосфодиоксиацетона. В положении равновесия отношение концентраций фосфодиоксиацетона и глицеральдегид-3-фосфата равно 22:1. Поэтому концентрации диоксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата при расчете кажущейся константы равновесия альдолазной реакции выражают как

[триозофосфат] · 22/33 и [триозофосфат] · 1/23 соответственно.

Тогда уравнение принимает следующий вид:

$$K = \frac{[\text{триозофосфат}] \cdot 22 \cdot [\text{триозофосфат}]}{[\text{фруктозодифосфат}] \cdot 23 \cdot 23}$$

или

$$K = \frac{[\text{триозофосфат}]^2 \cdot 22}{[\text{фруктозодифосфат}] \cdot 23^2}$$

3. ФОСФАТАЗНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ГЕКСОЗОФОСФАТОВ

ПРЕВРАЩЕНИЕ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА В ГЛЮКОЗУ

Расщепление глюкозо-6-фосфата на неорганический фосфат и глюкозу можно осуществить в процессе инкубации глюкозофосфата с гомогенатом печени крысы при pH 5,0. При данном значении водородного показателя расщепление глюкозо-6-фосфата будет осуществляться преимущественно неспецифической кислой фосфатазой (КФ 3.1.2.2), локализованной в лизосомах и являющейся маркерным ферментом этих клеточных органелл. Активность специфической глюкозо-6-фосфатазы в указанных условиях проявляться не будет, поскольку она полностью инактивируется в ацетатном буфере при pH 5,0.

О фосфатазном расщеплении глюкозо-6-фосфата судят по нарастанию неорганического фосфата и убыли глюкозо-6-фосфата в процессе инкубации. Предлагается определить значение водородного показателя, при котором скорость расщепления глюкозо-6-фосфата максимальна (pH оптимум кислой фосфатазы из печени крысы).

Получение безъядерного гомогената печени. Печень крысы (2 г) отмывают от крови в ледяном 0,9%-ном растворе NaCl, обсушивают фильтровальной бумагой и измельчают ножницами на чашке Петри, стоящей на льду. Навеску ткани переносят в стакан стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком, добавляют 3 объема 0,25 М раствора охлажденной сахарозы и гомогенизируют в течение 1 мин. Гомогенат сливают в стакан, добавляют еще 7 объемов 0,25 М раствора сахарозы, перемешивают и центрифугируют при 600 g в течение 10 мин. Супернатант фильтруют через 4 слоя влажной марли и до опыта хранят на холоду. Полученная фракция представляет собой 10%-ный безъядерный гомогенат. Желательно использовать гомогенат в день получения, так как фермент при хранении быстро теряет активность.

Реактивы:

1. Ацетатный буфер — 0,05 М, pH 5,0.
- 1а. Ацетатный буфер — 0,05 М, pH 4,6; 4,2; 5,4; 5,8.
2. Глюкозо-6-фосфат — 0,06 М раствор.
3. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор или хлорная кислота 0,5 н. раствор.
4. КОН — 2,0 н. раствор для нейтрализации HClO_4 .
5. NaOH или КОН — 0,4 н. раствор.
6. HCl — 1,0 н. раствор.
7. Реактивы для определения неорганического фосфата (с. 34).
8. Реактивы для определения глюкозо-6-фосфата энзиматическим методом с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (с. 41).

Определяют зависимость скорости фосфатазного расщепления при pH 5,0 от времени инкубации. Исследуют скорость фосфатазного расщепления глюкозо-6-фосфата при разных значениях водородного показателя и находят оптимум pH для неспецифической кислой фосфатазы, инкубируя пробы в течение 10 мин.

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав проб, мл			Время инкубации, мин
	ацетатный буфер	глюкозо 6-фосфат	гомогенат	
1,2	1,5	0,5	1,0	—
3,4	1,5	0,5	1,0	10
5,6	1,5	0,5	1,0	20

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») приливают по 3 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты или 0,5 н. HClO_4 до добавления гомогената. Пробы 3—6 инкубируют при 37°C в водяном термостате. По окончании инкубации в них добавляют по 3 мл 5%-ного раствора CCl_3COOH или 0,5 н. HClO_4 . Все пробы фильтруют или центрифугируют и в безбелковом фильтрате определяют неорганический фосфат и глюкозо-6-фосфат по нарастанию неорганического фосфата после щелочного гидролиза.

Для определения глюкозо-6-фосфата энзиматическим методом при осаждении белков используют 0,5 н. раствор хлорной кислоты. Из безбелкового раствора хлорную кислоту удаляют в виде перхлората калия (с. 29). Надосадочную жидкость используют для определения глюкозо-6-фосфата (с. 40).

ПРЕВРАЩЕНИЕ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА ВО ФРУКТОЗО-6-ФОСФАТ

Фруктозо-1,6-дифосфатаза (КФ 3.1.3.11) катализирует расщепление фруктозо-1,6-дифосфата на фруктозо-6-фосфат и неорганический фосфат. Фермент локализован в гиалоплазме, поэтому в качестве источника используют безмитохондриальный гомогенат печени крысы. Для проявления ферментативной активности необходимы ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} , оптимум водородного показателя сильно зависит от концентрации активизирующих ионов и природы буфера. В глициновом буфере в присутствии Mg^{2+} максимальная скорость наблюдается при pH 9,2. О фосфатазном расщеплении ФДФ судят по нарастанию неорганического фосфата в процессе инкубации.

Получение безмитохондриального гомогената печени. Гомогенат печени крысы получают, как описано на с. 65, но центрифугируют его при 15000 g в течение 15 мин. Супернатант фильтруют через четыре слоя влажной марли и хранят до опыта в холодильнике.

Реактивы:

1. Глициновый буфер — 0,01 М раствор, pH 9,2.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат — 0,06 М раствор.
3. MgCl_2 — 0,15 М раствор.
4. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор.
5. Реактивы для определения неорганического фосфата (с. 34).

Схема проведения опыта

№ пробы	Состав проб, мл				Время инкубации, мин
	глициновыи буфер	MgCl_2	фруктозо 1,6 дифосфат	гомогенат	
1,2	1,4	0,1	0,5	1,0	—
3,4	1,4	0,1	0,5	1,0	10
5,6	1,4	0,1	0,5	1,0	20
7,8	1,4	0,1	0,5	1,0	30

В пробы 1 и 2 (пробы «до инкубации») приливают по 3 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты до добавления гомогената. Пробы 3—8 инкубируют при 37°C в водяном термостате указанное время. По окончании инкубации в них добавляют по 3 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Все пробы фильтруют или центрифугируют и в безбелковом растворе определяют неорганический фосфат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Страйер Л. Биохимия. М., 1985. Т. 2
2. Метаболизм углеводов//Уайт А. и др. Основы биохимии. М., 1981. Т. 2. С. 541.
3. Биосинтез углеводов в животных тканях//Ленинджер А. Основы биохимии. М., 1985. Т. 2. С. 601.
4. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М., 1977.
5. Гликолиз//Косвер Э. Молекулярная биохимия. М., 1964. С. 14.
6. Вульфсон П. Л., Алексахина Н. В. Структура и функция гликогенфосфоорилазы//Структура и функция ферментов/Под ред. С. Е. Северина. М., 1972. Вып. 1. С. 60.
7. Ферментативная организация лизосом//Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М., 1976. С. 62.
8. Hers H. G., Hof F. van Enzymes of Glycogen Degradation in Biopsy Material//Methods in Enzymology. L., 1966. Vol. 8. P. 525.
9. Pontremoli S. Fructoso-1,6-diphosphatase I. Rabbit Liver (Crystallin)//Methods in Enzymology. N. Y.; L., 1966. Vol. 11. P. 625.
10. De Maine M. M. et al. Fructose-bisphosphatase, Zinc-Free, from Rabbit Liver//Methods in Enzymology. N. Y.; L., 1982. Vol. 90. P. 327.
11. Horecker B. L. et al. Fructose-1,6-bisphosphatase from Rabbit Liver (Neutral Form)//Methods in Enzymology. N. Y.; L., 1982. Vol. 90. P. 345.
12. Marcus F. et al. Fructose-1,6-bisphosphatase from Rat Liver//Methods in Enzymology. N. Y.; L., 1982. Vol. 90. P. 352.

IV. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

1. ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ РАБОТЫ С ЛИПИДАМИ

Экстракция липидов из биологического материала

Липиды — вещества, имеющие различное химическое строение, но обладающие общим свойством: высокой растворимостью в неполярных растворителях. Имеют гидрофобный характер. Различают нейтральные липиды (свободные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди- и триацилглицерины, стероиды, воски, углеводороды) и полярные липиды (глицерофосфолипиды, сфинго- и гликолипиды, цереброзиды).

При экстракции липидов принимают во внимание то, что они способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных связей (сложноэфирных, амидных, гликозидных). Относительно неполярные растворители (хлороформ, бензол, диэтиловый эфир) разрушают комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями в жировой ткани, хиломикроны, комплексы альбумина с жирными кислотами. Полярные растворители (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Их применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикулума. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза ком-

слабыми растворами кислот или щелочей в органическом растворителе.

Наиболее распространенным методом экстракции липидов является метод Фолча. Экстракцию проводят смесью хлороформ—метанол (2:1) из расчета 20 частей экстрагирующей смеси на одну часть ткани. Метод позволяет выделить 90—95% всех клеточных липидов. Смеси растворителей, содержащие спирт, экстрагируют также нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т. д.) Для удаления нелипидных примесей экстракт липидов промывают водой или слабыми солевыми растворами. Однако это приводит к частичной потере кислых липидов. Очистку экстракта можно провести также гель-фильтрацией на сефадексе.

Липиды легко подвергаются окислению и гидролитической деградации. Чтобы затормозить эти процессы, экстракцию липидов проводят при комнатной температуре, применяя растворители, из которых предварительно удален кислород. Извлеченные липиды не упаривают до суха и не оставляют в упаренном виде на долгое время, а сразу растворяют. Экстракты липидов следует хранить в плотно закрытой посуде при -20°C и ниже в присутствии инертных газов. Можно применять антиоксиданты, например 2,6-ди-трет-бутил-*p*-крезол, который в концентрации 0,005% эффективно предотвращает окислительное расщепление ненасыщенных липидов.

Некоторые растворители содержат или накапливают при хранении вещества, разрушающие липиды. Так, при хранении диэтилового и петролейного эфира накапливаются перекиси, окисляющие двойные связи. При хранении хлороформа и дихлорметана образуется фосген, реагирующий с окси- и аминогруппами. Небольшие количества альдегидов, содержащихся в первичных спиртах, также реагируют с окси- и аминогруппами и активированными метиленовыми группировками.

Чтобы удалить примеси, растворители подвергают специальной обработке. Свежий хлороформ перегоняют и хранят в темной склянке с добавлением 1% метанола или этанола. Хлороформ после длительного хранения промывают водой, сушат над хлористым кальцием и перегоняют. Метанол и этанол (95 или 99%) перегоняют над гранулированной гидроокисью калия, хранят в темной склянке 1—2 мес.

Свежие партии диэтилового и петролейного эфира можно использовать после однократной перегонки, если они не содержат перекисей. Для проверки к 2 мл растворителя добавляют 1 каплю раствора крахмала и 1 мл свежеприготовленного 10%-ного раствора KI. Если в растворителе содержатся перекиси, то при перемешивании пробы сразу появляется голубое окрашивание. Такой растворитель встряхивают с 20%-ным (об. %) раствором сульфата железа (II) в 1 н. растворе H_2SO_4 , затем со 100 мл воды, сушат над CaCl_2 и перегоняют.

Диэтиловый эфир можно освободить от перекисей и одновременно абсолютизировать обработкой алюмогидридом лития. Небольшими порциями, из расчета 5—10 г на 100 мл, его прибавляют к растворителю, нагревают в кипящей водяной бане растворитель с обратным холодильником в течение 1—2 ч, затем перегоняют.

Бензол, толуол, ацетон, этилацетат, четыреххлористый углерод можно использовать после простой перегонки и хранить в течение нескольких месяцев в стеклянной посуде, лучше из темного стекла.

Хранят растворители в металлических сейфах, вдали от нагревательных приборов.

Внимание! Все органические растворители: хлороформ, метанол, гексан, диэтиловый эфир — в той или иной степени **ядовиты**, поэтому

работать с ними нужно под тягой и ни в коем случае не насасывать в пипетку ртом.

Диэтиловый эфир легко воспламеняется, а пары его в воздухе образуют опасные горючие смеси (летуч, кипит при 36°C), поэтому при работе с ним **необходимо соблюдать осторожность!**

При работе с липидами необходимо пользоваться стеклянной посудой с шлифованными стеклянными пробками. **Смазкой для шлифов пользоваться нельзя!** Можно прикрывать колбы и пробирки алюминиевой фольгой.

Фракционирование липидов

Наиболее эффективным и широко применяемым методом фракционирования сложных смесей липидов является хроматография. Главную роль при аналитическом фракционировании играет адсорбционная хроматография в тонком слое сорбента. Этот метод также применяется в препаративных целях, когда разделению подвергается небольшое количество липидов (50—300 мг). Если масса липидов превышает 300 мг, используют колоночную хроматографию, хотя по разделяющей способности и времени разделения этот метод часто уступает тонкослойной и газовой хроматографии. Однократного хроматографирования обычно бывает недостаточно для выделения индивидуальных веществ, в связи с этим полученные фракции подвергают препаративной тонкослойной хроматографии или колоночной хроматографии другого типа. При колоночной хроматографии липидов используют не только принцип адсорбции, но и принцип распределения между двумя несмешивающимися жидкостями, гель-фильтрации, ионного обмена.

В основе адсорбционной хроматографии лежит разделение липидов в соответствии со степенью их полярности. Адсорбентом при тонкослойной хроматографии чаще всего служит силикагель. При колоночной хроматографии широкое применение получили три адсорбента: силикагель, окись алюминия, флоризил (силикат магния). Прочность взаимодействия липида с адсорбентом определяется главным образом водородными и ионными связями, в меньшей степени — силами Ван-дер-Ваальса.

Хроматография на силикагеле. Силикагель является продуктом полимеризации ортокремниевой кислоты (H_4SiO_4). Он выпускается рядом фирм в виде зерен различной величины. Адсорбционные свойства силикагеля обусловлены присутствием на поверхности зерен гидроксильных групп, которые за счет водородных связей взаимодействуют друг с другом и водой. Гидратированный силикагель мало активен как адсорбент. При нагревании от 50 до 150°C происходит дегидратация, приводящая к значительному увеличению адсорбционной способности силикагеля. Нагревание при температуре свыше 150°C способствует образованию силоксановых связей ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$), что снижает адсорбционную способность силикагеля. Такой силикагель уже нельзя реактивировать путем присоединения воды. Лучший способ избежать образования силоксановых групп — активация силикагеля нагреванием в вакууме при температуре 50°C .

Для тонкослойной и колоночной хроматографии применяют силикагели с размером зерен от 100 до 200 меш. Силикагели одного и того же типа, выпускаемые различными фирмами, и силикагели одной марки, но различных партий не всегда дают одинаковые результаты. Поэтому перед началом работы для каждой партии силикагеля необходимо с помощью специально приготовленных стандартных смесей проверить разделительную способность и порядок элюции отдельных

классов липидов. Кроме того, коммерческие силикагели содержат примеси липидов и их необходимо предварительно промыть смесью хлороформ—метанол (1:1) и высушить на воздухе в течение 12 ч, затем при 110°C в течение 2 ч.

Отечественный силикагель КСК с успехом может быть использован как для тонкослойной, так и для колоночной хроматографии. Его измельчают в шаровой мельнице с фарфоровыми шарами. Обычно 1 кг силикагеля размалывают в течение 5 ч. Затем просеивают через капроновое сито, отбирая фракцию с размером частиц 100—200 меш. Размолотый и просеянный силикагель обрабатывают кислотой для удаления примесей железа и других тяжелых металлов. 100 г адсорбента нагревают при 100°C в течение 10 ч при помешивании с 1,5 л 10%-ного раствора азотной кислоты. Кислоту декантируют, силикагель промывают 5 л дистиллированной воды, 1 л 0,5%-ного водного раствора аммиака, снова 5 л дистиллированной воды и 1 л метанола. Затем сушат на воздухе в течение 6—8 ч и активируют 24 ч при температуре 110—115°C. Хранят в герметически закрытом сосуде.

При хроматографии 1—3 г липидов пользуются колонками диаметром 35 мм и длиной 50—70 см. При разделении больших количеств применяют большие колонки, при этом максимальное весовое отношение липид/адсорбент не должно превышать 1:50 (для фосфолипидов 1:100). Отношение высоты колонки к площади ее сечения должно быть равно 5:1, длина колонки не должна быть больше 1 м.

Пластины для тонкослойной хроматографии липидов готовят, как указано на с. 72. При аналитической хроматографии толщина слоя силикагеля обычно не превышает 0,25 мм. Для препаративных целей используют слой толщиной 0,75—1,0 мм на пластинках размером 20×20 см. В некоторых случаях для лучшего разделения используют удлиненные пластинки (34×20 см). Для аналитического разделения липидов можно применять готовые пластинки «Силуфол» чехословацкого производства. Они представляют собой тонкий слой силикагеля, закрепленный на алюминиевой фольге с помощью крахмала. Для подготовки пластинок «Силуфол» к работе их необходимо активировать.

Хроматография на окиси алюминия. При проведении препаративных работ хроматография на окиси алюминия имеет ряд преимуществ по сравнению с хроматографией на силикагеле: требуются меньшие объемы растворов, скорость тока через колонку выше. Для хроматографии фосфолипидов используют окись алюминия IV степени активности. Ее получают путем активации коммерческой окиси алюминия при 110°C в течение 12 ч, после чего на каждые 100 г адсорбента добавляют 10 мл воды и встряхивают смесь в закрытом сосуде в течение 2 ч. При выделении больших количеств фосфолипидов используют стеклянные колонки с отношением диаметра к длине, равным 1:2,5, в которые помещают до 1000 г адсорбента. При работе с меньшим количеством адсорбента, до 100 г, применяют колонки с отношением 1:5. Нагрузка колонки не должна превышать 0,5 мг липидного фосфора на 1 г адсорбента.

Однако необходимо отметить, что хроматография многих липидных веществ на окиси алюминия сопровождается значительными потерями в результате гидролиза

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ

Липиды экстрагируют из тканей смесью Фолча, экстракт отмыывают от нелипидных примесей солевым раствором. Количественное

определение суммарных липидов проводят весовым методом.

Реактивы:

1. Хлороформ.
2. Метанол.
3. Смесь хлороформ—метанол в соотношении 2:1 по объему (смесь № 1).
4. NaCl—0,73%-ный водный раствор (можно заменить 0,88%-ным KCl, 0,05%-ным CaCl₂).
5. Смесь растворителей, содержащая минеральные соли: хлороформ—метанол—водный раствор NaCl (0,58%) или KCl (0,74%) или CaCl₂ (0,04%) в соотношении 3:48:47 (смесь № 2).

Измельченную на холоде навеску ткани (200—250 мг мозга, 300—500 мг других тканей) помещают в гомогенизатор с тефлоновым или стеклянным пестиком, заливают 5 объемами смеси № 1 и гомогенизируют в течение 5 мин. Экстракт отделяют от биомассы, сливают в мерный цилиндр. Процедуру повторяют еще 2—3 раза. Измельченную ткань вместе с экстрактом количественно переносят в мерный цилиндр (конечное разведение ткани 1:20), перемешивают и через 20 мин фильтруют через обезжиренный фильтр или центрифугируют при 1000 g в течение 15—20 мин. К центрифугату добавляют 0,73%-ный водный раствор хлорида натрия в объеме, составляющем 20% от объема экстракта липидов. Экстракт перемешивают и центрифугируют при 600 g в течение 15—20 мин. После центрифугирования система разделяется на две фазы. Верхнюю фазу осторожно декантируют с помощью шприца и пипетки с оттянутым концом, отбрасывают. Поверхность нижней фазы и внутренние стенки центрифужной пробирки ополаскивают 3 мл смеси № 2, тщательно следя за тем, чтобы не было перемешивания нижней фазы и промывной смеси. Последнюю отбрасывают и промывание повторяют еще 2 раза. После удаления промывной смеси к нижней фазе, т. е. к хлороформному раствору липидов, прибавляют по каплям метанол до образования однофазной системы, раствор перемешивают.

Количество липидов определяют весовым методом.

Круглодонную колбу для роторного испарителя доводят до постоянного веса, помещают в нее экстракт липидов, содержащий не менее 10—20 мг липидов, растворитель упаривают на роторном испарителе. Колбу с осадком липидов доводят до постоянного веса в вакуум-эксикаторе над КОН. Путем повторного взвешивания определяют вес осадка липидов и рассчитывают содержание липидов в тканях в процентах с учетом взятой навески. Взвешивание проводят на аналитических весах.

Данную работу можно проводить, пользуясь бюксами или небольшими стаканчиками и термостатом при температуре 60°C.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МОЗГОВОЙ ТКАНИ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ В ТОНКОМ СЛОЕ

Липиды экстрагируют из ткани органическими растворителями, разделяют с помощью хроматографии в тонком закрепленном слое силикагеля, извлекают из сорбента и определяют количественно, используя специфические цветные реакции.

Реактивы:

1. Хлороформ.
2. Метиловый спирт.
3. Гексан.
4. Диэтиловый эфир (эфир серный).
5. Силикагель.
6. Холестерин — 1 %-ный хлороформный раствор.
7. Холестерин — 0,1 мг/мл (стандартный раствор).
8. Фосфатидилэтаноламин (кефалин) — 1 %-ный хлороформный раствор.
9. Свиное сало.
10. CH_3COOH — ледяная.
11. H_2SO_4 — концентрированная.
12. Фосфорномолибденовая кислота — 10 %-ный спиртовой раствор.
13. Уксусный ангидрид.
14. Реактивы для определения фосфора (с. 34).
15. CaSO_4 (гипс).

20 %-ный раствор CaCl_2 приливают при энергичном помешивании к 20 %-ному раствору H_2SO_4 . Выпавший мелкодисперсный осадок промывают водой до нейтральной реакции, высушивают и прокаливают при 180°C в течение 1—2 сут. Полученный гипс хранят в плотно закрытой банке.

Экстракция липидов из мозговой ткани. В небольшую коническую колбу с притертой пробкой помещают 300—400 мг мозговой ткани. Ткань растирают стеклянной палочкой и заливают 25 мл свежеприготовленной смеси хлороформа и метилового спирта (2:1). Содержимое колбы энергично встряхивают в течение 3—5 мин и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем фильтруют через маленький бумажный складчатый фильтр в фарфоровую чашку и упаривают досуха на бане при температуре не выше 80°C . Осадок растворяют в 1 мл хлороформа; полученный раствор хранят в пробирке с притертой пробкой.

Приготовление пластинок. Пластины тонкого закрепленного слоя силикагеля готовят заранее следующим образом.

Стеклянные пластины размером $17,5 \times 13$ см тщательно моют свежеприготовленной хромовой смесью и ополаскивают много раз водопроводной водой, затем 3—5 раз дистиллированной, вытирают чистой марлей, протирают спиртом и хранят в чистом полиэтиленовом пакете в отдельной коробке.

Неподвижной фазой при разделении служит силикагель КСК, для закрепления силикагеля используют химически чистый гипс CaSO_4 . Силикагель измельчают и используют фракцию с размером частиц 100—200 меш (с. 70).

Для проведения количественного определения фосфолипидов по фосфату нужно проверить силикагель на содержание в нем фосфора. Если «фон» фосфора значителен, силикагель промывают водой, многократно перемешивая суспензию, оставляют на 8—12 ч, после чего воду с самыми мелкими частицами осторожно сливают, а силикагель высушивают в кюветах на воздухе, сначала при комнатной температуре, а затем в течение 48 ч при 110 — 115°C .

Для приготовления сорбционной массы 6 г силикагеля и 0,35 г гипса энергично встряхивают 3—5 мин в колбочке (можно с резиновой пробкой, защищенной пленкой). Смесь высыпают в ступку и постепен-

но, при тщательном растирании, небольшими порциями по 3—5 мл добавляют дистиллированную воду — всего 15—17 мл. Смешивание силикагеля и гипса с водой заканчивают в течение 1,5—2 мин (следить по секундомеру!). Полученная масса должна быть однородна и без пузырьков воздуха.

Готовую смесь тонкой непрерывной струей выливают в центр пластинки и покачиванием пластинки распределяют ее ровным слоем по всей поверхности. Пластинку сушат при комнатной температуре 24 ч на столике с уровнем, а затем активируют в сушильном шкафу при 105°C в течение 40 мин. Если пластинки не используют сразу, их хранят в эксикаторе над CaCl_2 .

Подготовка хроматографической камеры. Разгонку проводят смесью растворителей гексан—диэтиловый эфир—ледяная уксусная кислота в соотношении 78:25:2 в любом герметически закрытом сосуде с плоским дном (крышку можно притирать к стенкам сосуда смазкой). Стенки камеры для лучшего насыщения выстилают фильтровальной бумагой и в камеру наливают смесь растворителей. Во время разгонки бумага должна быть на вид сухая. Следить за тем, чтобы она не погружалась в растворитель, иначе последний будет перетекать на пластинку. Плотную закрытую камеру оставляют на 2—3 ч для насыщения парами растворителя.

Нанесение экстракта на пластинку. Хлороформный экстракт липидов наносят на пластинку с помощью микропипетки. Линия старта должна быть на расстоянии 1,5 см от узкого края пластинки, расстояние между точками нанесения — не менее 1—2 см. Раствор наносят очень маленькими каплями, не прикасаясь пипеткой к пластинке, либо в одну точку, либо узкой горизонтальной полоской (8 мм), капля к капле. Общий объем наносимого экстракта — 0,05—0,1 мл.

Свидетели: 1%-ные хлороформные растворы холестерина, фосфатидилэтаноламина и триацилглицеринов (свиное сало), наносят в количестве 0,04—0,05 мл в отдельные точки.

Разделение и проявление. Пластинку помещают в камеру, погружая ее в растворитель на 5 мм. Камеру герметически закрывают. Разгонка продолжается 1 ч при комнатной температуре (для лучшего разделения липиды можно разгонять повторно, предварительно высушив пластинку). Пластинку высушивают на воздухе в течение 30 мин и хроматограмму проявляют, осторожно опрыскивая ее из пульверизатора 10%-ным спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты, и затем (через 1 мин) выдерживают ее в сушильном шкафу при 80—100°C до появления на желтом фоне синих пятен липидов. Избыток проявителя может привести к заметному увеличению окраски фона.

Расположение липидов на хроматограмме следующее: на старте или почти на старте — фосфолипиды, выше — неидентифицированные соединения, затем холестерин, моно-, ди- и триацилглицерины, эфиры холестерина. Между ди- и триацилглицеринами должны располагаться свободные жирные кислоты, но они не проявляются фосфорномолибденовой кислотой¹⁸ (проявители свободных жирных кислот: родамин, или 0,2%-ный спиртовой раствор 2,6-дихлорфлуоресцеина в ультрафиолете).

Количественное определение фосфолипидов и холестерина. Для количественного определения липидов хлороформный раствор наносят на пластинку с силикагелем в две крайние точки линии старта. Между

¹⁸ Все липиды проявляются в парах йода.

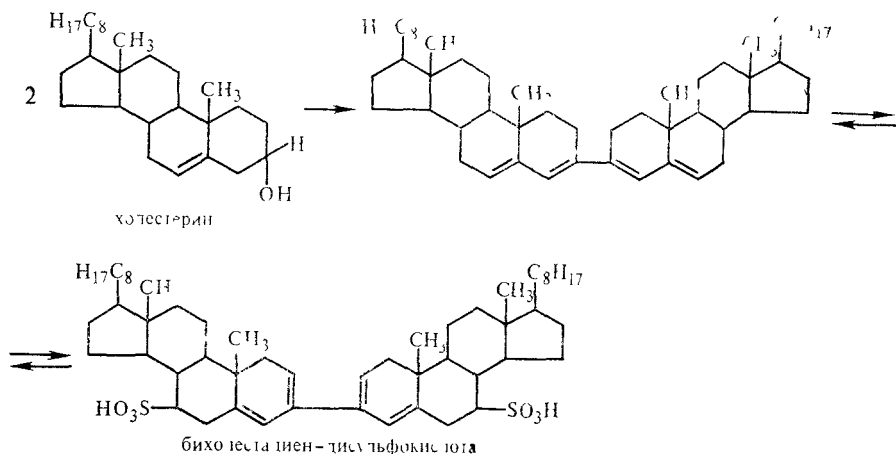
ним также в две точки наносят смесь стандартных растворов тех веществ, количество которых нужно определить. Проявляют только одну половину пластинки, на которой расположены одна проба опытной смеси и одна — стандартной. Вторую половину пластинки при опрыскивании проявителем осторожно закрывают плотной бумагой. Таким образом, вторая проба опытной и стандартной смеси остается для количественных измерений. Локализацию отдельных представителей липидов в непроявленной части пластинки устанавливают путем сопоставления ее с проявленной половиной.

Фосфолипиды. Количественное определение фосфолипидов сводится к измерению содержания фосфата, входящего в состав этих соединений.

Участок силикагеля, содержащий фосфолипиды, а также чистый контрольный участок силикагеля такой же площади и расположенный на том же уровне, осторожно соскабливают с пластинки и переносят в центрифужные пробирки. Добавляют по 4 мл 1 н HCl , приготовленной на метиловом спирте, тщательно размешивают и помещают в водяную баню при $50-60^\circ\text{C}$ на 15 мин. Силикагель отделяют центрифугированием на небольшой скорости (2500 об/мин) в течение 5—10 мин. Центрифугат сливают в колбочки Кьельдаля (или в жаростойкие пробирки) и упаривают на водяной бане досуха. В колбочки добавляют по 0,2—0,25 мл концентрированной H_2SO_4 и проводят минерализацию в течение 1 ч. В минерализате определяют фосфат (с. 45) и рассчитывают суммарное содержание фосфолипидов.

Холестерин. В основе количественного определения холестерина лежит цветная реакция холестерина с серной кислотой. Под влиянием концентрированной H_2SO_4 и уксусного ангидрида холестерин превращается в углеводород с суммарными формулами $\text{C}_{54}\text{H}_{86}$ и $\text{C}_{54}\text{H}_{88}$ (бихолестадиены), которые с серной кислотой образуют диеновые кислоты: с двумя молекулами H_2SO_4 — продукт красного цвета, с одной молекулой H_2SO_4 — продукт зеленого цвета (реакция Либермана—Бухардта).

Участок силикагеля, содержащий холестерин, а также контрольный участок (чистый силикагель) соскребают, размельчают, переносят в центрифужные пробирки и элюируют 5 мл хлороформа при тща-



тельном помешивании в течение 1 мин. Силикагель отделяют на центрифуге (5—10 мин при 1500 об/мин), хлороформенный слой сливают. Отбирают из него точный объем (4 мл), выпаривают досуха, в сухом остатке проводят количественное определение холестерина. Для этого пробирки с сухими остатками, контрольную пробу на реактивы и две пробирки со стандартом чистого холестерина (5—100 мкг в пробирке) помещают на песчаную баню с температурой 110—120°C на 30 мин. Затем в пробирки добавляют по 1 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой, не вынимая из бани. Выдерживают 1—2 мин (по секундомеру) и переносят все пробы в водяную баню с температурой 25°C на 10 мин (до полного выравнивания температуры), приливают по 2 мл смеси уксусного ангидрида с концентрированной H_2SO_4 (20:1). Смесь готовят непосредственно перед употреблением, сливая охлажденные растворы. Пробы инкубируют в темноте при 25°C 30 мин и измеряют интенсивность зеленой окраски на ФЭКе или на спектрофотометре при длине волны 625 нм.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

Липиды печени крыс экстрагируют смесью хлороформ — метанол (2:1). Триацилглицерины выделяют с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

Реактивы:

1. NaCl — 0,9%-ный раствор.
2. Метиловый спирт.
3. Хлороформ.
4. Диэтиловый эфир.
5. Бензол.
6. Гексан.
7. Силикагель (100—200 меш).

Экстракция липидов. Печеночную ткань 100 крыс промывают физиологическим раствором, просушивают на фильтровальной бумаге, взвешивают и измельчают ножницами на холоде. Порции по 5 г ткани гомогенизируют в смеси хлороформ-метанол (2:1) в течение 1—2 мин. Полученные экстракты объединяют, разводят такой же смесью из расчета 20 мл на 1 г ткани, перемешивают и через 20 мин фильтруют через пористый фильтр. К фильтрату добавляют 0,2 объема воды, смесь интенсивно встряхивают в делительной воронке и оставляют до полного разделения фаз. Водный слой отсасывают, а нижний упаривают в роторном испарителе. Остаток (2—3 г) растворяют в 10—14 мл сухого бензола и хранят в холодильнике.

Хроматографическое разделение липидов на колонке. 150 г силикагеля, обработанного, как указано на с. 69, суспендируют в 500 мл гексана и вносят в колонку (50×3,5 см), следя за тем, чтобы адсорбент при вытекании растворителя упаковывался равномерно в плотный слой без пузырьков воздуха. Для этого колонку слегка встряхивают постукиванием деревянной палочкой или резиновой трубкой, надетой на стеклянную палочку. Необходимо также следить за тем, чтобы верхний слой силикагеля постоянно находился под слоем растворителя. Колонку промывают 150 мл чистого растворителя, оставляют над поверхностью силикагеля слой жидкости в 1—2 мм и наносят на колонку раствор ли-

пидов. Затем добавляют 2 раза по 10 мл гексана, дожидаясь каждый раз полного впитывания растворителя в силикагель. Колонку элюируют 1 л смеси гексан—диэтиловый эфир (85:15) и 250 мл диэтилового эфира со скоростью 5 мл/мин, собирая фракции по 10 мл и контролируя разделение с помощью тонкослойной хроматографии. Фракции с одинаковыми значениями R_f объединяют и упаривают.

Массу триацилглицеринов определяют весовым методом. Продукт хранят в виде 5%-ного бензольного раствора при -5°C .

Порядок элюирования

Номера фракций*	Масса элюированных веществ, мг	Состав фракции
1—20	—	—
21—47	550	эфиры холестерина
48—50	—	—
51—53	130	триацилглицерины, следы метиловых эфиров жирных кислот
54—104	1005	триацилглицерины
105—120	115	жирные кислоты, холестерин, диацилглицерины

* Фракции 1—104 — гексан-эфир, фракции 105—120 — эфир.

Анализ фракций методом тонкослойной хроматографии. Хроматографическое разделение образцов проводят на пластинках силикагеля в системе гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (85:15:1). Приготовление пластинок и их проявление осуществляют, как описано на с. 72.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ ИЗ ЯИЧНЫХ ЖЕЛТКОВ

Яичные желтки, обрабатывая ацетоном, освобождают от всех липидов, за исключением фосфолипидов. Последние из остатка экстрагируют смесью хлороформа и метилового спирта, осаждают ацетоном и хроматографируют на колонке с Al_2O_3 . Полученные фракции подвергаются анализу с использованием тонкослойной хроматографии. Вся работа по выделению фосфолипидов проводится в холодной комнате.

Реактивы:

1. Яичные желтки — 10 шт.
2. Этиловый спирт.
3. Метиловый спирт.
4. Ацетон.
5. Хлороформ.
6. Петролейный эфир
7. *n*-Бутиловый спирт
8. Фосфорномолибденовая кислота.
9. Ледяная уксусная кислота.
10. Нингидрин.
11. Al_2O_3 .

Фракционированное осаждение фосфолипидов. Яичные желтки тщательно отделяют от белка и гомогенизируют в течение 10 мин с 400 мл ацетона. Гомогенат оставляют в холодной комнате на ночь. Осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, суспендируют в 400 мл ацетона и снова отделяют центрифугированием. Обработку ацетоном повторяют. Затем осадок наносят тонким слоем на фильтровальную бумагу и высушивают до исчезновения запаха ацетона 1—2 ч.

Высушенный порошок заливают 200 мл смеси хлороформ — метиловый спирт (1:1). Проводят экстрагирование фосфолипидов при встряхивании на механической качалке в течение 30 мин. Раствор центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Центрифугат отделяют и сохраняют. Обработку осадка повторяют. Если центрифугирование не дает полного просветления надосадочной жидкости, проводят фильтрование на воронке Бюхнера. Центрифугаты (фильтраты) объединяют и выпаривают на роторном испарителе.

После выпаривания смесь фосфолипидов растворяют в 50 мл петroleйного эфира и добавляют 20-кратный объем (1000 мл) ацетона. Пере­мешивают и оставляют на ночь. Осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера, растворяют в 50 мл петroleйного эфира и осаждение повторяют. Растворы в петroleйном эфире обычно бывают мутными. После повторного осаждения и фильтрования осадок промывают 200 мл ацетона прямо на фильтре.

Хроматографическое разделение фосфолипидов на колонке с Al_2O_3 . Колонка диаметром 2,5 см высотой не менее 50 см заполняется за 1—2 сут до разделения фосфолипидов. На дно помещают плотный слой стеклянной ваты толщиной 1 см, затем приливают суспензию из 170—190 г Al_2O_3 в смеси метанол—хлороформ (1:1). При заполнении колонки следует слегка постукивать по ней деревянной палочкой для равномерного оседания и для получения равномерного слоя адсорбента.

Сверху можно положить бумажный фильтр.

Полученную смесь фосфолипидов (10—15 г) растворяют в смеси метанол—хлороформ (1:1) и наносят на колонку. Фосфатидилхолин с примесью лизофосфатидилхолина и сфингомиелина вымывается 500 мл смеси метанол—хлороформ (1:1). Первые 150 мл и последние 100 мл отбрасывают. После выхода фосфатидилхолина колонку промывают 100 мл той же смеси. Фосфатидилэтаноламин с примесью фосфатидилсерина вымывается 50 мл смеси этанол—хлороформ—вода (5:2:2). Первые 200 мл отбрасывают. Оба элюата упаривают на роторном испарителе досуха и получают приблизительно 5 г лецитина (фосфатидилхолина) и 2,5 г кефалина (фосфатидилэтаноламина).

Анализ фосфолипидов с помощью тонкослойной хроматографии. Для тонкослойной хроматографии используют пластинки «Силуфол» (150×150 мм) и стандартные камеры. В качестве растворителя берут смесь хлороформ—метанол—вода (65:25:4).

На две пластинки на расстоянии 1,5 см от их узкого края наносят микропипеткой хлороформные растворы фракций фосфатидилхолина (в одно пятно) и фосфатидилэтаноламина (в другое пятно) в количестве около 1—5 мкмоль. Пластинки помещают в камеру (предварительно за 2—3 ч для насыщения камеры в нее помещают растворитель). После разделения одну пластинку проявляют 5%-ным спиртовым раствором фосфомолибденовой кислоты (с фосфатидилхолином образуются синие пятна на желтом фоне), другую — 0,3%-ным раствором нингидрина на *n*-бутаноле, содержащем 3%-ную уксусную кислоту. Проявляются все фосфолипиды, содержащие NH_2 -группу (фосфатидилэтанол-

лами, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин), в виде розовых пятен на белом фоне.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Кейтс М Техника липидологии. М., 1975.
2. Препаративная биохимия липидов/Под ред. Л. Д. Бергельсона, Э. В. Дятловской М., 1981
- 3 Методы изучения состава и метаболизма липидов различных тканей//Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)/Под ред. М. И Прохоровой Л., 1982 С 54
- 4 Куксис А Липиды//Хроматография. Практическое приложение метода/Под ред. Э Хефтмана М., 1986 Ч I. С 130

ПРИРОДНЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Второй раздел практикума ставит своей целью познакомить студентов с особенностями выделения, фракционирования, идентификации и количественного определения различных природных азотсодержащих соединений. белков, пептидов, аминокислот, нуклеиновых кислот, нуклеотидов и пр. Предлагаемые экспериментальные работы включают наиболее широко используемые в лабораторной практике современные методы разделения и анализа этих соединений: различные виды электрофореза, хроматографии, спектрофотометрии, колориметрии и др. Работа проводится как на готовых коммерческих препаратах высоко- и низкомолекулярных азотсодержащих соединений, так и на препаратах, выделяемых студентами из различных тканей лабораторных животных.

Предлагаемые в данном разделе методы имеют общий характер и используются студентами при выполнении задач последующих разделов практикума, в частности в разделе «Препаративная энзимология» и др.

Навыки, получаемые в данном разделе практикума, имеют основополагающий характер и должны помочь будущим молодым специалистам в овладении технически более сложными методами, применяемыми в современной биохимии и молекулярной биологии. Работа студентов в данном разделе построена таким образом, что отдельные методы исследования осваиваются не независимо, а объединяются в задачи, подчиненные определенной научной цели, например:

1) определение чистоты препарата, молекулярной массы и аминокислотного состава белка (рибонуклеазы, лизоцима, гистонов и др.); чистоту оценивают по количеству белка в препарате, электрофорезом в полиакриламидном геле и определением N- или C-концевых аминокислот; молекулярную массу анализируют гельхроматографией на колонке и в тонком слое, а также электрофорезом в присутствии ДСН; аминокислотный состав определяют после гидролиза электрофорезом на бумаге или хроматографией;

2) определение азотсодержащих соединений в сыворотке крови; задача включает определение общего азота, белка, фракционирование белков электрофорезом на бумаге, в полиакриламидном и агаровом гелях, ионообменной и адсорбционной хроматографией на колонках; определение N- или C-концевых аминокислот и молекулярной массы сывороточного альбумина; определение свободных аминокислот;

3) выделение ДНК (или РНК) из ткани печени и определение их нуклеотидного состава, задача включает выделение ДНК (РНК) и определение их количества спектрофотометрическим и колориметрическим методами; гидролиз ДНК (РНК) и анализ нуклеотидного состава методами электрофореза и хроматографии на бумаге, а также в тонком слое, разделение рестриктов ДНК фага λ электрофорезом в геле агарозы или расщепление РНК рибонуклеазой и анализ фрагментов;

4) получение препарата АДФ и характеристика его чистоты; задача включает выделение миозина, характеристику его активности и числа

экстракции, получение фрагментов миозина ферментативным путем; гидролиз АТФ миозином и выделение АДФ методом ионообменной хроматографии на колонке; анализ полученного препарата АДФ электрофоретическими и хроматографическими методами;

5) определение азотсодержащих соединений мышечной ткани; задача включает определение общего азота, белка, небелкового азота, экстрактивных веществ; анализ свободных аминокислот и адениловых нуклеотидов с использованием различных методов хроматографии и электрофореза и их количественную оценку; определение никотинамидных коферментов; определение суммарного содержания нуклеиновых кислот.

А. БЕЛКИ

Белки — высокомолекулярные биополимеры, структурными элементами которых являются α -аминокислоты. Молекулярная масса белков варьирует в очень широких пределах: от 10 000 Да до нескольких сотен тысяч и более. Физико-химические и физические свойства белков определяются качественным и количественным составом входящих в них аминокислот.

1. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Общий белок в тканях определяют по азоту после их минерализации. Растворимые белки экстрагируют из тканей, осаждают и после растворения осадка в щелочи определяют различными методами.

1. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

БИУРЕТОВЫЙ МЕТОД

Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей с ионами двухвалентной меди. Существуют две разновидности этого метода: при одной из них определяют от 2 до 10 мг белка в пробе, чувствительность другой (микрометода) — от 0,1 до 2 мг.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, например сывороточного альбумина, содержащий 10 мг в 1 мл.
2. Биуретовый реактив: 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) растворяют в 50 мл H_2O , при энергичном перемешивании приливают туда 30 мл 10%-ного раствора NaOH (свободного от Na_2CO_3), добавляют 0,1 г KI и раствор доводят водой до 100 мл. Хранят в парафинированной или полиэтиленовой склянке.

К 1 мл раствора, содержащего от 2 до 10 мг белка, добавляют 4 мл биуретового реактива. Пробы перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин, после чего колориметрируют на ФЭКе при 540 нм.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику (с. 9). Определению мешает присутствие солей аммония.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, например сывороточного альбумина, содержащий 1 мг в 1 мл.
2. Биуретовый реактив для микроопределения (реактив Бенедикта): 17,3 г цитрата натрия и 10 г Na_2CO_3 растворяют при подогревании в небольшом количестве воды. В раствор добавляют 1,73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды, и доводят водой до 100 мл.
3. NaOH — 6%-ный раствор.

К 2 мл раствора, содержащего 0,1—2 мг белка, добавляют 2 мл 6%-ного раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Раствор хорошо перемешивают и через 15 мин фотометрируют при 330 нм на спектрофотометре. Предварительно строят калибровочный график по стандартному раствору белка.

МЕТОД ЛОУРИ

Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью (10—100 мкг белка в пробе). На развитие окраски влияет большое количество веществ: компоненты буферных систем (трис-буфер в концентрации 0,2 мМ, глицилглицин), восстановители (цистеин, дитиотреитол в концентрации 0,01—0,4 мМ, аскорбиновая кислота), комплексоны (ЭДТА в концентрации 0,5 мМ), детергенты (тритон X-100 в концентрации 0,1—0,2% вызывает выпадение осадка), сернокислый аммоний в концентрации 0,15%, сахара в концентрации 10% и др.

В связи с этим при построении калибровочного графика для определения белка по Лоури в растворитель для стандартного белка необходимо включать все компоненты, содержащиеся в анализируемых пробах. В некоторых случаях целесообразно предварительное осаждение белков из растворов, например трихлоруксусной кислотой, с последующим растворением их в щелочных растворах, или очистка белковых растворов от низкомолекулярных компонентов путем диализа или гель-фильтрации на сефадексе G-25.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, содержащий 0,25 мг в 1 мл.
2. Na_2CO_3 — 2%-ный раствор в 0,1 н. растворе NaOH .
3. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,5%-ный раствор в 1%-ном цитрате натрия.
4. Рабочий раствор: 1 мл реактива 3 в день определения смешивают с 50 мл реактива 2.
5. Реактив Фолина—Чокальтеу: 10 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (перекристаллизированный) и 2,5 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ помещают в круглодонную колбу на 200—250 мл, приливают 70 мл воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной HCl (х. ч.). Колбу присоединяют к обратному холодильнику (на шлифе), ставят на сетку и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г Li_2SO_4 , 5 мл воды и одну каплю брома. Раствор перемешивают и нагревают для удаления брома. После охлаждения доводят водой до 100 мл, фильтруют и разводят во-

дой с таким расчетом, чтобы получился 1 н. раствор кислоты (т. е. приблизительно вдвое). Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз реактива 0,1 н. щелочью в присутствии фенолфталеина. Реактив может храниться в темной склянке длительное время.

6. CCl_3COOH — 10%-ный раствор.

7. NaOH — 1 н. раствор.

К 0,4 мл исследуемого раствора, содержащего 10—100 мкг белка, приливают 2,0 мл рабочего раствора (4), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляют 0,2 мл реактива Фолина—Чокальтеу, содержимое пробирки тщательно перемешивают и через 30 мин колориметрируют при 750 нм. Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику.

В случае предварительного осаждения белка к исследуемому раствору добавляют CCl_3COOH из такого расчета, чтобы конечная концентрация ее была равна 3—4%. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на 10—20 мин. Выпавший осадок белка отделяют центрифугированием и промывают 2%-ным раствором CCl_3COOH . К осадку добавляют 1—2 мл 1 н. раствора щелочи и осторожно подогревают до растворения осадка белка. Раствор белка количественно переносят в мерную колбу на 25—50 мл, доводят водой до метки, тщательно перемешивают и проводят определение белка.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В ПРИСУТСТВИИ НЕИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ

Для солюбилизации мембранных белков часто используют неионные детергенты, такие как тритон X-100, твин-80 и др. Эти детергенты влияют на развитие окраски при определении белка с биуретовым реактивом и методом Лоури. Практически полного удаления детергентов из пробы можно добиться экстракцией их изоамиловым спиртом.

Реактивы:

1. Изоамиловый спирт.

2. Хлороформ.

3. Реактивы для определения белка по методу Лоури (с. 81).

0,5 мл раствора белка (10—100 мкг), содержащего тритон X-100, смешивают с 0,5 мл 1 н. раствора NaOH и 3 мл рабочего раствора (п. 4, с. 81). После 10-минутного выдерживания при комнатной температуре к полученной смеси добавляют 3 мл изоамилового спирта и снова тщательно перемешивают. Смесь центрифугируют 10 мин при 2000 g. Верхний слой, содержащий изоамиловый спирт, осторожно удаляют с помощью шприца. Оставшуюся жидкость (4 мл) помещают в чистую пробирку, прибавляют 0,38 мл реактива Фолина—Чокальтеу и после тщательного перемешивания к смеси добавляют 2,0 мл хлороформа для удаления следов изоамилового спирта. Все тщательно перемешивают, затем хлороформ удаляют после центрифугирования 15 мин при 2000 g. Окраска развивается в течение 30 мин, после чего раствор колориметрируют при 750 нм. При построении калибровочного графика в стандартные пробы добавляют те же компоненты, что и в опытные.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mather J. H., Tamplin C. B. A method for the determination of protein in the presence of Triton X—100//Anal. Biochem. 1979. Vol. 93, N 1. P. 139.

Метод основан на связывании с белками одного из кислых красителей кумасси синего, выпускаемого в двух модификациях: R-250 и G-250. При связывании с белками спектр поглощения красителя меняется; интенсивности окраски от концентрации белка в пробе и диапазоне 1—10 мкг/мл имеет линейную зависимость.

Многие из исследованных соединений (фосфат, цитрат, пирофосфат, ацетат, HEPES, MOPS, MES, BES, PIPES, трис, какодилат, формат, дитиотреитол, ЭГТА, глицин, тирозин, а также аденозин, АТФ, тимидин, ДНК, РНК, полиадениловая кислота) не влияют на развитие окраски. Наличие в среде инкубации амфолинов вызывает значительное увеличение оптической плотности. Поскольку белки различаются по своей способности связывать красители, желательно строить калибровочный график с использованием того белка, концентрацию которого в дальнейшем предполагают определять.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, содержащий 0,05 мг в 1 мл.
2. Раствор красителя. 10 мг красителя (*Coomassie brilliant blue G*) гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе в 5 мл 95%-ного спирта. Полученный раствор смешивают с 10 мл 95%-ной фосфорной кислоты, разводят водой до конечного объема 100 мл. Отфильтрованный раствор красителя хранится при комнатной температуре около двух недель.
1,5 мл раствора, содержащего от 10 до 50 мкг белка, смешивают с 1,5 мл раствора красителя. Через 3—5 мин измеряют оптическую плотность при 595 нм, используя в качестве контроля пробу, не содержащую белка. В описанной модификации A_{595} линейно зависит от количества белка в интервале от 10 до 50 мкг.

2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Метод основан на способности ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и в меньшей степени фенилаланина) поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом при 280 нм. Измеряя величину оптической плотности при этой длине волны, находят количество белка в растворе. Поскольку белки отличаются по содержанию ароматических аминокислот, их поглощение в ультрафиолетовой области спектра может сильно различаться. Условно считают, что при концентрации «усредненного» белка в растворе, равной 1 мг/мл, величина оптической плотности при 280 нм равна 1,0 (при толщине слоя жидкости в 1 см).

Определению белка данным методом мешает присутствие нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Измеряя оптическую плотность раствора при 260 нм (для учета поглощения соединений нуклеотидной природы) и 280 нм, содержание белка рассчитывают с помощью номограммы (рис. 6): экспериментально полученные величины оптической плотности при 260 и 280 нм находят в соответствующих столбцах номограммы и соединяют их прямой линией; точка пересечения этой прямой со шкалой, на которой дана концентрация белка, определяет содержание белка в исследуемом растворе.

Содержание белка можно найти по формуле Калькара на основе данных определения оптической плотности при 280 и 260 нм:

$$\text{Содержание белка} = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260} \text{ (мг/мл)}.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В ПРЕПАРАТАХ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА СЕФАРОЗЕ

Для определения содержания иммобилизованного белка можно в принципе использовать все известные методы, применяющиеся при работе с растворимыми белками. Однако из-за светорассеяния, характерного для гелей агарозы, быстрого оседания их частиц, а также адсорбции красителей на гелях в определение содержания белка внесены отдельные модификации. Могут быть рекомендованы спектрофотометрический и колориметрический методы.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

Внесение раствора полиэтиленгликоля препятствует оседанию частиц сефарозы и снижает их светорассеяние. Метод позволяет определять белок в препаратах, содержащих не менее 10 мкг белка на 1 мл осажденного центрифугированием геля.

Реактивы:

1. Полиэтиленгликоль (м.м. = 20 000 Да) — 50%-ный водный раствор.
2. Суспензия сефарозы 4В с иммобилизованным белком.
3. Суспензия неактивированной сефарозы.
4. Стандартный раствор белка — 0,5—2,0 мг в мл.

В спектрофотометрическую кювету с длиной оптического пути 1 см вносят 0,2—1,0 мл суспензии иммобилизованного на сефарозе белка и добавляют 50%-ный раствор полиэтиленгликоля до общего объема 3 мл. После тщательного перемешивания смеси (пузырьки воздуха должны быть полностью удалены) измеряют оптическую плотность при 280 нм, используя в качестве контроля раствор полиэтиленгликоля, смешанный с соответствующим количеством неактивированной сефарозы. Содержание белка в препаратах определяют по калибровочному графику, построенному с использованием смеси раствора полиэтиленгликоля с суспензией неактивированной сефарозы после внесения различных количеств стандартного раствора белка (10—20 мкг). Для построения калибровочного графика необходимо использо-

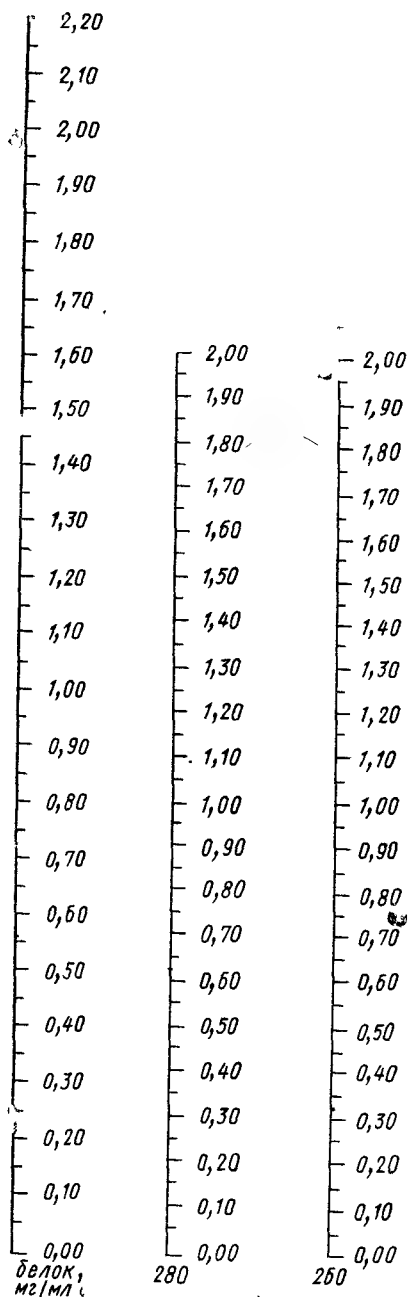


Рис. 6. Номограмма для определения белка

вать в качестве стандарта именно тот белок, который находится в исследуемом препарате в иммобилизованном состоянии.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО МОДИФИЦИРОВАННОМУ МЕТОДУ БРЭДФОРД

Реактивы

1. Раствор красителя кумасси G-250 (с. 83).
2. Суспензия сефарозы с иммобилизованным белком.
3. Суспензия неактивированной сефарозы.
4. Стандартный раствор белка 0,2—1,0 мг/мл.

В спектрофотометрическую кювету с длиной оптического пути 1 см вносят 0,1 мл суспензии иммобилизованного на сефарозе белка, добавляют 2 мл раствора кумасси, перемешивают при комнатной температуре 2—3 мин и быстро измеряют оптическую плотность смеси при 595 нм, используя в качестве контроля кювету, содержащую 0,1 мл суспензии неактивированной сефарозы и 2 мл красителя. Для построения калибровочного графика к 0,1 мл суспензии неактивированной сефарозы добавляют от 2 до 20 мкг исходного препарата белка и 2 мл раствора красителя, а затем измеряют оптическую плотность. С помощью данного метода можно определить содержание белка в препаратах иммобилизованных ферментов, содержащих более 10 мкг белка в 1 мл суспензии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Golovina T. O. et al. A convenient method for the estimation of sepharose-bound protein//Anal. Biochem. 1977. Vol. 83, N 2. P. 778.
2. Asryan R. A. et al. Determination of sepharose-bound protein with coomassie brilliant blue G-250//Anal. Biochem. 1985. Vol. 151, N 2. P. 571.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПО АЗОТУ

Определение основано на том, что содержание азота в большинстве белков практически одинаково и может быть принято равным 16%. По количеству определенного азота находят количество белка в пробе. При нагревании органического соединения с концентрированной серной (хлорной) кислотой происходит его минерализация, азот переходит в сернокислый аммоний (перхлорат аммония), и его можно определить количественно.

Из существующих разновидностей метода в настоящем руководстве предлагается проводить определение содержания азота в биологическом материале путем изотермической перегонки (метод Конвея), позволяющим открывать от 1 до 10 мкмоль азота в пробе, и микрометодом (по Енике), чувствительность которого от 0,02 до 0,2 мкмоль азота в пробе.

ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ ПЕРЕГОНКА АММИАКА (МЕТОД КОНВЕЯ)

Аммиак, вытесненный из растворов солей аммония сильными щелочами, поглощается раствором кислоты известной концентрации. Оставшуюся кислоту титруют щелочью (или образующийся сернокислый аммоний подвергают несселеризации) и вычисляют содержание аммиака в исследуемой пробе. Разложение солей аммония и поглощение аммиа-

(рис. 7). Чашки напоминают кристаллизатор с низкими стенками, в центральную часть которого впаивают внутренний цилиндр. Чашка плотно закрывается стеклянной крышкой, пришлифованной к внешнему цилиндру.

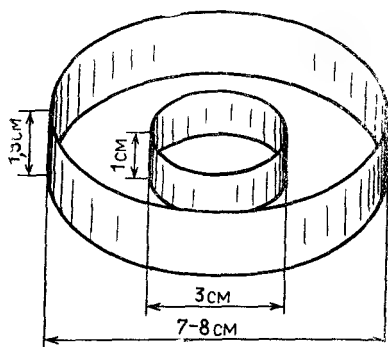


Рис. 7. Чашка Конвея

Реактивы:

1. H_2SO_4 или HCl — 0,005 или 0,01 н. растворы, концентрированная H_2SO_4
2. NaOH — 0,005 или 0,01 н. растворы.
3. K_2CO_3 (поташ) — насыщенный раствор (может быть заменен 10%-ным NaOH).
4. Индикатор Ташира (смесь метилового красного и метиленовой

сини). Окраска метилового красного на фоне метиленовой сини в кислом растворе будет фиолетово-красной, в щелочном — зеленой.

Основной раствор: 40 мл 0,1%-ного спиртового раствора метилового красного и 10 мл 0,1%-ного спиртового раствора метиленовой сини.

Рабочий раствор: 1 объем основного раствора, 1 объем спирта и 2 объема воды.

5. Реактив Несслера — щелочной раствор комплексной соли ртути [K_2HgI_4].

Приготовление реактива Несслера. 10 г KI растворяют в 15 мл воды, добавляют 15 г HgI_2 , тщательно перемешивают и туда же приливают 80 мл 50%-ного раствора NaOH (не содержащего углекислых солей). Перемешивают и общий объем доводят водой, не содержащей CO_2 , до 500 мл. Оставляют на сутки, после чего фильтруют через стеклянную вату. Раствор должен быть прозрачным.

Минерализация биологического материала. Пробу, содержащую 10—20 мг белка, помещают в колбу Кьельдаля, добавляют 0,5 мл концентрированной серной кислоты и проводят минерализацию (с. 44). Для учета количества аммиака в реактивах и воде параллельно опытным пробам ставят контрольные, в которых минерализации подвергается дистиллированная вода. После этого пробы количественно переносят в мерные колбы на 25—50 мл, осторожно нейтрализуют до слабокислой реакции на метиловый красный (индикатор добавляют в пробу, следя за тем, чтобы реакция не стала щелочной) и доводят водой до метки. Из раствора берут пробы для определения аммиака.

Изотермическая перегонка. Перед заполнением на шлиф чашки наносят вакуумную смазку или смесь из воска и вазелина. Во внутренний цилиндр наливают 1 мл 0,005—0,01 н. кислоты, чашку слегка наклоняют и во внешний цилиндр помещают 1 мл исследуемого раствора (необходимо следить за тем, чтобы раствор не растекался по всей поверхности чашки). Возвращают чашку в горизонтальное положение и, придерживая левой рукой крышку, в противоположный конец внеш-

ней части чашки наливают 1 мл насыщенного раствора углекислого калия. Чашку быстро закрывают и вращательными движениями перемешивают содержимое внешнего цилиндра. Ставят на 2 ч в термостат при 37°C или оставляют при комнатной температуре на 24 ч. После этого определяют количество аммиака во внутреннем цилиндре методом титрования или с реактивом Несслера.

Определение аммиака методом титрования. Во внутренний цилиндр чашки добавляют 1—2 капли индикатора Ташира и титруют раствором щелочи до появления зеленого окрашивания. При правильном приготовлении индикатора переход окраски от фиолетовой к зеленой происходит от одной капли щелочи. По разности в количестве щелочи, прошедшей на титрование контрольной и опытной проб, рассчитывают количество аммиака в исследуемом растворе, учитывая, что 1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4 связывает 0,14 мг азота. По количеству найденного азота рассчитывают количество белка в опытной пробе.

Определение аммиака с реактивом Несслера. Определение основано на том, что реактив Несслера с аммиаком образует красно-коричневый осадок. При очень небольших количествах аммиака осадка не образуется, а раствор приобретает желтый с коричневым цвет; интенсивность окраски зависит от количества аммиака.

Из внутреннего цилиндра чашки Конвея отбирают в пробирку 0,2 (0,3) мл раствора. Приливают туда 9,5 (9,4) мл 0,002 н. H_2SO_4 и 0,3 мл реактива Несслера. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, оставляют на 5 мин при комнатной температуре и колориметрируют при 540 нм. Для построения калибровочного графика используют 0,01 н. раствор сернистого аммония.

На основании полученных результатов рассчитывают количество белка в опытной пробе (с. 85).

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗОТА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (ПО ЕНИКЕ)

Метод основан на образовании индофеноловой сини при конденсации аммиака в щелочной среде с фенольным реагентом (реакция Бертло). Образующуюся синюю окраску измеряют на колориметре при 578 нм.

Реактивы:

1. Фенольный реактив: 1 мл 85%-ного раствора фенола, 2,5 мл 0,2%-ного раствора нитропрусида натрия и 36,5 мл H_2O . Реактив хранят в темной склянке в холодильнике. Стабилен в течение нескольких недель.
2. Щелочной раствор гипохлорита: 0,02 М раствор NaOCl в 2,5 н. растворе NaOH . Титр основного раствора гипохлорита проверяют йодометрическим титрованием. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.
3. Стандартный раствор азота: 0,01 М раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
4. HClO_4 — 57%-ный или 5 н. растворы.

Минерализация биологического материала. Пробы, содержащие азот, подвергают сжиганию в присутствии хлорной кислоты (0,06 мл 57%-ного раствора или 0,1 мл 5 н. раствора HClO_4). Минерализацию проводят в термостойких пробирках, которые помещают в песчаную баню или специальный алюминиевый блок с отверстиями для пробирок.

Сначала выпаривают H_2O при 110°C , затем продолжают сжигание при $205\text{—}215^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. Пробирки охлаждают при комнатной температуре.

Определение азота. В пробы добавляют по 1,0 мл H_2O и фенольного реактива, 0,4 мл щелочного раствора гипохлорита и сразу же содержащее пробирок тщательно перемешивают круговыми движениями. Оставляют при комнатной температуре на 20 мин. Оптическую плотность определяют колориметрически против пробы, не содержащей азота.

Для построения калибровочного графика в 6 пробирок вносят стандартный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержащий от 0,02 до 0,2 мкмоль азота, доводят водой до 1,0 мл, приливают по 0,06 мл 57%-ного раствора HClO_4 и перемешивают. Дальнейший ход определения, как для исследуемых образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Дж. Методы химии белков. М., 1965. С. 265.
2. Штрауб Ф. Биохимия. Будапешт. 1965. С. 62.
3. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980. С. 222.
4. Плехан М. И. Спектрофотометрия биуретовых комплексов как метод исследования полипептидов и белков//Химия белка. М., 1961. С. 191.
5. Байер Е. М. Некоторые данные о применимости метода Лоури в зависимости от различных условий определения белка//Лабораторное дело. 1976. № 10. С. 590.
6. Белов П. Применение 18-вольфрамо, молибдено-фосфорного аммония для определения белка по методу Лоури//Лабораторное дело. 1975. № 5. С. 303.
7. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953.
8. Скоулс Р. Методы очистки белков. М., 1985.
9. Spector T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation//Anal. Biochem. 1978. Vol. 86, N 1. P. 142.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding//Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, N 2. P. 248.
11. Schaffner W., Weismann C. A rapid sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution//Anal. Biochem. 1973. Vol. 56, N 3. P. 502.

II. МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

Для фракционирования белковых смесей, находящихся в растворе, широкое применение получили методы дробного осаждения, основанные на изменении растворимости белков в присутствии растворов солей и органических растворителей. При фракционировании солями чаще всего используют сернокислый аммоний, позволяющий создавать высокую ионную силу раствора при низкой температуре, а из органических растворителей — этиловый спирт и ацетон. На различиях в растворимости белков основано и изоэлектрическое осаждение, достигаемое за счет минимальной растворимости глобулярных белков в изоэлектрической точке. В последние годы для фракционирования белков все чаще находят применение центрифугирование, избирательная адсорбция, различные виды хроматографии и электрофореза.

1. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Метод основан на том, что молекулы белка обладают электрическим зарядом, величина и знак которого определяются аминокислотным составом белка, рН и ионной силой окружающей среды. Под влиянием

внешнего электрического поля заряженные молекулы передвигаются в растворе к противоположно заряженному полюсу. Скорость перемещения белковых частиц пропорциональна величине их заряда и обратно пропорциональна размеру частиц и степени их гидратации.

Широкое распространение в настоящее время получил так называемый «зональный электрофорез» — электрофорез на твердом носителе (на бумажных полосах, агаре, крахмале, акриламиде), пропитанном буферным раствором с нужным значением pH. Положение белков на бумаге или геле определяют путем фиксации и последующего окрашивания их тем или иным красителем (обычно бромфеноловым синим, амидовым черным или кумасси синим). Количество белка в каждой фракции можно ориентировочно определять по интенсивности окраски связанного красителя. Такое определение не дает строго количественного соотношения белковых фракций, так как количество красителя, связываемого различными белками, неодинаково.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА БУМАГЕ

Разделение анализируемой смеси происходит на определенных сортах хроматографической бумаги, пропитанной буферным раствором, в приборах для электрофореза. Белки разделяют при напряжении до 500 В. Схема одного из вариантов приборов для низковольтного электрофореза представлена на рис. 8.

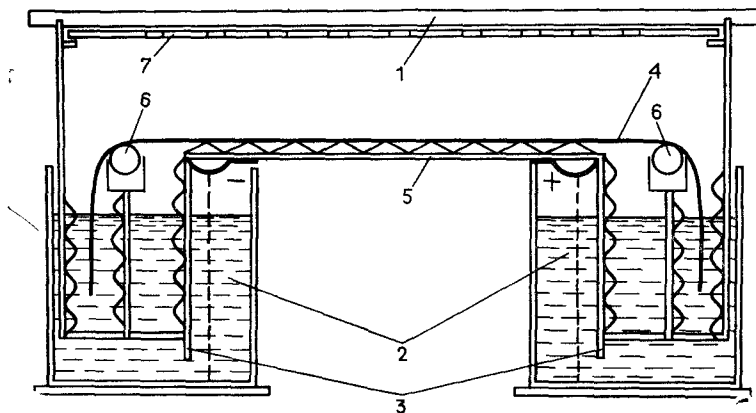


Рис. 8. Схема прибора для низковольтного электрофореза на бумаге (объяснения в тексте)

Камера для электрофореза состоит из плексигласовой ванны с пригнанной к ней крышкой (1). В ванне имеются 2 электродных отсека (2), каждый из которых разделен продольной перегородкой (3) на два отделения, сообщаемые между собой. Во внутренние отделения отсеков опускают электроды, а во внешние — концы бумажных полос (4), основную часть которых располагают на горизонтальной пластинке с шипами (5), находящейся в центральной части камеры. Между горизонтальной пластинкой и наружным отделением электродных отсеков имеются палочки (6), через которые перекидываются бумажные полоски и которые служат для их поддерживания. Под верхней крышкой камеры находится сделанная из плексигласа пластинка с большими круглыми отверстиями (7), на которую сверху кладутся смоченные в ди-

стиллированной воде, сложенные в 4—5 раз листы фильтровальной бумаги. Эти листы способствуют увеличению герметичности камеры и как следствие — уменьшению испарения жидкости с электрофореграмм в процессе электрофореза.

Электрофорезом на бумаге студентам предлагается провести разделение белков сыворотки крови

Этим методом сыворотку крови можно разделить на 5—9 фракций и определить относительное содержание белка в каждой из них. Разделение проводят в буферном растворе (рН 8,6—8,9) при градиенте потенциала 3—5 В/см (120—350 В для полос длиной 40—45 см) при комнатной температуре. Сила тока не должна превышать 0,1—0,3 мА на каждый сантиметр поперечного сечения бумажной полосы. Увеличение силы тока более чем в 2 раза недопустимо, так как при этом происходит чрезмерное нагревание, значительное увеличение испарения и в конечном итоге — прогорание бумаги

Реактивы:

1. Буферный раствор. Можно использовать:

- а) веронал-медианоловый буфер (рН 8,6): в 300 мл дистиллированной воды растворяют 10,32 г медианала (натриевая соль веронала), добавляют 1,84 г веронала, нагревают при помешивании на водяной бане до растворения и доводят водой до 1 л;
- б) веронал-ацетатный буфер (рН 8,6): в 300 мл дистиллированной воды растворяют 4,3 г веронала, 0,95 г едкого натра и 3,24 г уксуснокислого натрия. К раствору приливают 30 мл 0,1 М раствора HCl и доводят водой до 1 л;
- в) трис-буфер (рН 8,9): в 1 л дистиллированной воды растворяют 60,5 г триса, 6 г этилендиаминтетрауксусной и 4,6 г борной кислоты.

2. Растворы для окраски электрофореграмм:

- а) кислый сине-черный краситель (аналогичный амидовому черному 10 Б) — 0,2 г в смеси: уксусная кислота (ледяная) — 100 мл + метиловый спирт — 900 мл;
- б) бромфеноловый синий — 0,5 г, сулема — 10 г, уксусная кислота (ледяная) — 20 мл, дистиллированная вода — 980 мл;
- в) бромфеноловый синий — 0,1 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 50 г, уксусная кислота (ледяная) — 50 мл, дистиллированная вода — 900 мл.

3. Растворы для отмывания электрофореграмм от несвязавшейся с белком краски и закрепления красителя на белке:

- а) уксусная кислота — 2%-ный раствор;
- б) уксуснокислый натрий — 2%-ный раствор, приготовленный на 10%-ном растворе уксусной кислоты.

4. Растворы для элюции окрашенных продуктов с электрофореграмм:

- а) для извлечения бромфенолового синего — 0,01 М раствор NaOH;
- б) для извлечения кислого сине-черного красителя — 0,1 М раствор NaOH.

5. Бумага хроматографическая: ленинградская, FN 4, FN 5, ватман 3, ватман 3ММ и др.

Получение сыворотки крови

Из уха кролика набирают 2—3 мл крови в сухую центрифужную пробирку и оставляют на 1/2—1 ч. Тонкой стеклянной палочкой осто-

рожно обводят стенки пробирки для отделения от них сгустка, центрифугируют и сыворотку сливают в чистую пробирку.

Подготовка камеры. Отсеки для электродов наполняют буферным раствором до одинакового уровня (во избежание перетекания буфера), примерно по 800 мл в каждый отсек. Во внутренние части электродных отсеков погружают электроды. На листе хроматографической бумаги (18×45 см) (при использовании тонких сортов бумаги образцы лучше наносить на отдельные полосы шириной 4—5 см) на расстоянии 15 см от одного из его узких сторон простым мягким карандашом (графит препятствует растеканию жидкости) очерчивают места для нанесения проб. Они представляют собой прямоугольники (2×0,3 см), большие стороны которых располагают перпендикулярно длине бумажной полосы. Расстояние между стартовыми зонами и краями электрофореграммы — 2 см. Электрофореграмму пропитывают буфером, в котором будет проходить электрофорез. Для этого ее протягивают через кювету с буферным раствором. Концы бумажных полос (6—8 см) не смачивают. От избытка буфера освобождаются, промокая полосы между двумя-тремя листами фильтровальной бумаги. Влажную электрофореграмму помещают в камеру на центральную горизонтальную пластинку (5), а концы опускают в наружные отделения электродных отсеков. Прибор плотно закрывают крышкой, под которой находятся смоченные водой листы фильтровальной бумаги.

Проведение электрофореза. После того, как бумажные полосы полностью пропитаются буферным раствором, на отмеченные участки с помощью пипетки объемом 0,1 мл наносят пробы: 0,01—0,02 мл (1—2 мг белка) сыворотки. Камеру закрывают крышкой и включают ток. Длительность электрофореза составляет 22—24 ч при напряжении 200—300 В.

Фиксация и окраска электрофореграмм. По окончании электрофореза выключают ток и тотчас вынимают электрофореграммы из прибора. Их располагают на специальной подставке и подсушивают на воздухе под тягой, затем — в сушильном шкафу при 105 °С в течение 20 мин для фиксации белков на бумаге, после чего помещают в эмалированную кювету, заливают красителем и оставляют на 2—3 ч и более. Краситель сливают и электрофореграммы отмывают от его избытка, заливая 3—4 раза 2%-ным раствором уксусной кислоты, каждый раз на 5—10 мин. Участки бумаги, не содержащие белка, должны быть полностью освобождены от красителя. Для закрепления окрашенных продуктов электрофореграммы на 2 мин заливают 2%-ным раствором уксуснокислого натрия и сушат на воздухе под тягой.

Определение соотношения отдельных фракций белка. При pH 8,6 белки сыворотки крови заряжены отрицательно и перемещаются в электрическом поле к аноду. Быстрее всего к аноду движется фракция, альбуминов, затем идут α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины (рис. 9, А). Участки бумажных лент, на которых проявились пятна белков, делят поперечными линиями простым карандашом на полосы шириной в 3—5 мм и разрезают по этим линиям. Каждую полосу измельчают и помещают в отдельную пронумерованную пробирку, заливают 3 мл 0,01 М раствора NaOH, оставляют на час для извлечения краски из бумаги, а затем находят для каждого раствора значение оптической плотности на ФЭКе при 612 нм. Параллельно обрабатывают контрольную пробу. Для нее вырезают полосу из неокрашенных участков электрофореграммы.

На основании полученных данных строят кривую распределения окрашенных продуктов на электрофореграмме. На оси абсцисс отмеча-

ют номера пробирок, на оси ординат — соответствующее значение оптической плотности (рис. 9, Б). Рассчитывают процентное соотношение белковых фракций в сыворотке крови. Для этого вычерченную кривую делят по минимумам на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям. Величина площади каждого участка пропорциональна количеству кра-ски, соединившейся с белком данной фракции. Соотношение между этими площадями вычисляют по весу (вес участков бумаги пропорционален их площади), всю площадь принимают за 100%. При наличии денситометра соотношение белковых фракций в сыворотке крови можно определить из денситограммы.

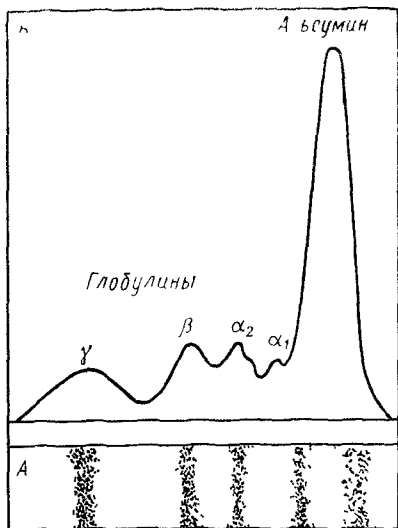


Рис 9 Электрофореграмма сыворотки крови человека (А) и кривая распределения белковых фракций на электрофореграмме (Б)

Предварительно определяя содержание белка в сыворотке, рассчитывают его количество для каждой фракции.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ

Подобно крахмальному и акриламидному агаровый гель является очень мягким носителем: в отличие от электрофореза на бумаге при нем не происходит инактивации белков, что позволяет определять активность отдельных фракций белков непосредственно в геле после проведения электрофореза. Приготовление агарового геля значительно проще, чем крахмального или полиакриламидного, продолжительность электрофореза составляет 1—4 ч.

Студентам предлагается провести электрофоретическое разделение белков сыворотки крови.

Электрофорез сыворотки крови проводят в 1%-ном агаре в ме-динал-вероналовом буфере (рН 8,6) с ионной силой 0,05. Все белки сыворотки при рН 8,6 заряжаются отрицательно и перемещаются в электрическом поле в сторону анода. Однако практически медленно продвигающиеся фракции белков сыворотки обычно движутся в сторону катода. Аномальное движение этих фракций объясняется наличием в агаровом геле электроэндоосмотического тока жидкости, направленного в описанных выше условиях от анода к катоду, а также тока жидкости, возникающего при неравномерном испарении воды с поверхности геля. Неравномерное испарение приводит к неравномерному распределению электрического поля в нем. Уменьшить испарение воды можно двумя способами: 1) герметически закрывая электрофоретическую камеру во время электрофореза, 2) проводя электрофорез при низкой температуре (в холодильнике или холодной комнате, буферный раствор должен быть заранее охлажден).

Реактивы:

1. Мединал-вероналовый буфер (рН 8,6; ионная сила 0,1): в 500 мл воды растворяют 17,52 г мединала, добавляют 2,76 г веронала и, помешивая, нагревают в теплой водяной бане до растворения веронала. Затем раствор доводят дистиллированной водой до 1 л.
2. Агар — 1%-ный раствор. Агар должен быть чистым и прозрачным. Для его очистки из коммерческого препарата готовят 2%-ный раствор на дистиллированной воде. Горячий раствор разливают в ванночки слоем толщиной в 1—1,5 см. После застывания агаровую пластинку разрезают на кубики, помещают их в толстостенный стакан и промывают в течение двух суток под струей водопроводной воды, затем в течение суток — дистиллированной водой, сменив ее 4—5 раз. Агар обсушивают фильтровальной бумагой, помещают в колбу, разогревают, горячий раствор разводят в 2 раза буферным раствором и трижды фильтруют через 3 слоя марли. Раствор агара хранят в холодильнике. Перед нанесением на пластинки его нагревают на кипящей водяной бане, пока он не станет свободным от пузырьков воздуха.
3. Амидовый черный 10 Б — 0,1%-ный раствор в 2%-ной CH_3COOH .
4. CH_3COOH — 5%-ный раствор.

Приготовление агаровых пластинок и проведение электрофореза.

Для приготовления агаровых пластинок используют предметные стекла. Предварительно их обезжиривают, тщательно промывают водой и высушивают. Стекла нумеруют, укладывают на строго горизонтальную поверхность и на каждое осторожно наливают пипеткой с широким концом 4 мл агара. Пузырьки воздуха в агаре необходимо вывести пипеткой на края стекла. Когда агар застынет и образуется твердый гель, в нем посередине вырезают лунку (щель) для нанесения исследуемого раствора. Приготовленные пластинки укладывают в электрофоретическую камеру. Агаровое плато соединяют с буферным раствором «бумажными мостиками» из фильтровальной бумаги. В щель каждой пластинки вводят сыворотку крови, предварительно разведенную буферным раствором. На электрофореграмму наносят около 100—300 мкг белка в объеме 0,01 мл. Прибор подключают к источнику тока. Медленно повышая напряжение, доводят силу тока до 20—25 мА (напряжение 200—300 В). Электрофорез проводят в течение 3—4 ч.

Обработка агаровых пластинок. После окончания электрофореза ток выключают, предметные стекла с агаровым гелем тотчас извлекают из камеры и помещают на 30 мин в 5%-ный раствор CH_3COOH . Каждую пластинку покрывают листочком фильтровальной бумаги, смоченным в 5%-ном растворе CH_3COOH , для удаления воды и солей и высушивают при комнатной температуре в течение ночи. Для ускорения высушивания его проводят при температуре 37 °С или под струей теплого воздуха. Бумагу, приставшую к агаровой пленке, осторожно снимают, предварительно смочив ее водой. Перед окрашиванием агаровое поле должно быть совершенно сухим и прозрачным. Окрашивание белков на электрофореграммах проводят амидовым черным 10 Б в течение ночи. Не связавшийся с белком краситель отмывают 5%-ным раствором уксусной кислоты. Отмытые электрофореграммы высушивают при 37 °С.

Метод обладает большой разрешающей способностью в связи с тем, что разделение белковых смесей идет не только по заряду, но и по размерам и форме частиц. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет ряд преимуществ: химическая стабильность и инертность геля, возможность получения гелей с заданной величиной пор, отсутствие адсорбции и электроосмоса, устойчивость к растворителям, изменениям температуры и рН.

Использование диск-электрофореза в полиакриламидном геле, т. е. электрофореза в неоднородной разделяющей среде, добавляет к этому эффект концентрирования, что позволяет проводить разделение белков из разбавленных растворов без их предварительного концентрирования.

Электрофоретическое разделение белков проводят как в трубочках, так и в тонком слое полиакриламидного геля (слабе).

Реактивы:

1. ТЕМЕД — реактив стаблен при хранении в холодильнике в неразбавленном виде. К полимеризуемой смеси его добавляют непосредственно перед разливкой.
2. Персульфат аммония $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ — 1%-ный раствор, свеже-приготовленный.
3. Амидовый черный 10 Б — 0,5%-ный раствор в 7%-ной CH_3COOH . Раствор стабилен при комнатной температуре.
4. Кумасси R-250 — 0,1%-ный раствор, приготовленный на 7%-ном растворе CH_3COOH .
5. CH_3COOH — 7%-ный раствор.
6. Сахароза — 40%-ный раствор.

Реактивы для разделения белков с $pI < 7,5$

7. Электродный буферный раствор, рН 8,3: 6,0 г триса и 28,8 г глицина растворяют в воде и доводят до 1 л. Раствор стабилен при хранении в холодильнике. При использовании в работе основной раствор разбавляют в 10 раз.
8. Буферный раствор для приготовления геля, рН 8,9. К 36,3 г триса добавляют 48 мл 1 н. раствора HCl и объем доводят водой до 100 мл. Раствор стабилен.
9. Раствор акриламида: 28 г акриламида и 0,735 г N,N'-метиленабисакриламида растворяют в 100 мл воды (сначала растворяют метилен-бисакриламид, затем акриламид); раствор стабилен.
10. Бромфеноловый синий — 1 мг в 100 мл воды.

Реактивы для разделения белков с $pI > 7,5$

- 7'. Электродный буферный раствор, рН 4,5: 31,2 г β -аланина и 8 мл ледяной уксусной кислоты доводят водой до 100 мл; перед использованием разбавляют в 10 раз.
- 8'. Буферный раствор для приготовления геля, рН 4,3: 48 мл 1 н. раствора KOH смешивают с 17,2 мл ледяной уксусной кислоты и доводят водой до 100 мл.
- 9'. Раствор акриламида: 60,0 г акриламида и 0,4 г метиленбисакриламида растворяют в 100 мл воды.

10'. Метиленовый зеленый — 0,1%-ный раствор.
Внимание! Акриламид токсичен. Работу проводят под тягой, в перчатках!

Электрофорез в трубочках

Для проведения электрофореза можно использовать прибор фирмы «Реанал» (описание к прибору прилагается). Прибор (рис. 10) состоит из двух резервуаров для буферных растворов емкостью 1,5 л.

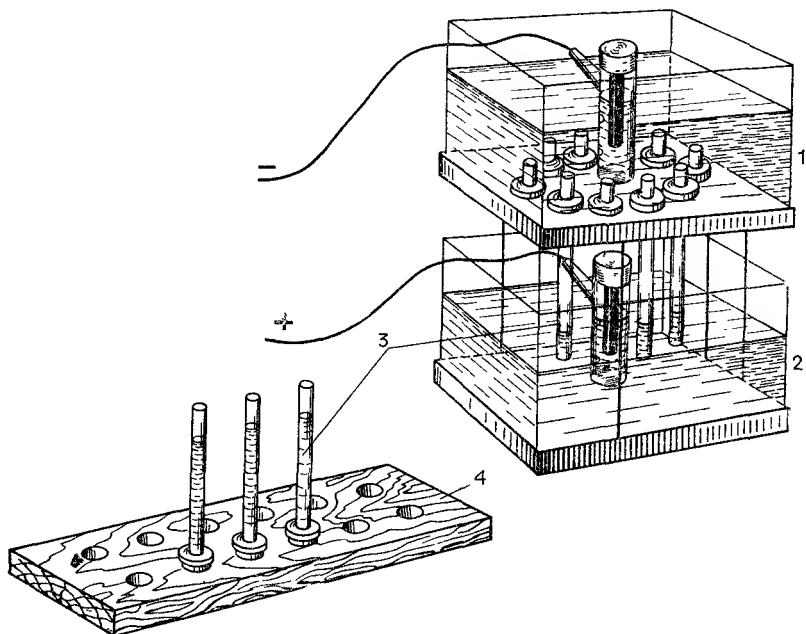


Рис. 10 Аппарат для электрофореза в полиакриламидном геле фирмы «Реанал». 1, 2 — электродные камеры, 3 — трубки с гелем; 4 — штатив для трубок

В центре резервуаров в специальных держателях закреплены электроды. В дне верхнего резервуара имеются отверстия для стеклянных трубочек, которые укрепляются зажимными кольцами с резьбой (прилагаются к прибору вместе с конусными и резиновыми кольцами-прокладками). Для полимеризации геля тщательно вымытые трубочки фиксируют на специальной подставке из оргстекла. Герметичность сборки проверяется заранее, до заполнения их гелем.

Смесь для получения 7%-ного геля в щелочной буферной системе: реактив 8—12,5 мл; реактив 9—25,0 мл; реактив 1—0,05 мл; реактив 2—10,0 мл; доливают водой до 100 мл.

Смесь для получения 15%-ного геля в кислой буферной системе: реактив 8'—12,5 мл; реактив 9'—25,0 мл; реактив 1—1 мл; доводят водой до 50 мл и добавляют 50 мл 0,28%-ного раствора персульфата аммония.

Смесь для полимеризации следует готовить в количестве, необходимом для опыта. Если используют, например, 12 трубочек, нужно приготовить 30 мл смеси. Осторожным вращением колбочки раствор перемешивают и вносят пипеткой в трубочки, укрепленные в подставке, следя за тем, чтобы пузырьки воздуха не попали внутрь полимеризуемого геля. Уровень вносимой жидкости должен находиться на расстоянии 1—1,5 см от верхнего края трубочки. Сверху осторожно накладывают воду (0,2—0,3 мл) для образования ровной поверхности геля. Полимеризация обычно заканчивается через 20—40 мин, что определяют по образованию хорошо видимой границы между гелем и водой. По окончании полимеризации наложенную воду удаляют фильтровальной бумагой. Трубочки снимают с подставки и ввинчивают в отверстия дна верхнего буферного резервуара (рис. 10, 1). Верхний резервуар присоединяют к нижнему, предварительно заполненному электродным буферным раствором. Следят за тем, чтобы на концах трубочек не было пузырьков воздуха. На поверхность геля микропипеткой наносят растворы белков. Количество наносимого белка зависит от его гомогенности: для индивидуального белка — 25—50 мкг, для гетерогенных смесей это количество может быть увеличено до 50—250 мкг. Плотность наносимых образцов белка повышают добавлением 40%-ного раствора сахарозы до конечной концентрации 0,5 М (20%). Это необходимо для предотвращения смешивания белка с электродным буфером. Высокая ионная сила исследуемых образцов мешает четкому разделению белков, поэтому такие растворы следует предварительно обессолить.

После нанесения образцов белка в трубочки накладывают электродный буфер, затем заливают буфер в верхний резервуар. При использовании щелочных буферных растворов в них добавляют раствор бромфенолового синего из расчета 0,5—1 мл красителя на 500 мл раствора, а в случае кислых буферов — метиленовый зеленый. Краситель маркирует движущийся пограничный слой во время электрофореза.

Аппарат для электрофореза подключают к соответствующим полюсам источника постоянного тока, учитывая величины изоэлектрических точек разделяемых белков и рН буферной системы. При исследовании лабильных белков аппарат помещают в холодильник. В первые 5—10 мин электрофорез проводят при силе тока 1,5—2,0 мА на трубочку, затем силу тока увеличивают до 4—5 мА. Электрофорез заканчивают, когда окрашенная полоса достигнет нижнего конца трубочки¹.

После завершения электрофореза прибор отключают от источника тока, сливают буферный раствор, трубочки вынимают из прибора и с помощью стальной иглы (под слоем воды) или водой, вводимой шприцом между поверхностью геля и стенкой трубочки, выталкивают столбик геля в 7%-ный раствор уксусной кислоты. Столбики геля помещают в пробирки и добавляют раствор красителя амидового черного 10 Б. Время окрашивания 5—10 мин. В качестве красителя можно использовать кумасси R-250. В этом случае прокрашивают 1—2 ч при комнатной температуре. После окрашивания избыток красителя отмывают 7%-ным раствором уксусной кислоты, цилиндрики геля сохраняют в том же растворе кислоты.

¹ В некоторых случаях перед разделением опытных смесей до добавления белка предварительно проводят электрофорез, при котором удаляются побочные продукты полимеризации, которые могут ухудшить электрофоретическое разделение, а также персульфат аммония, который ингибирует активность некоторых ферментов. Условия предварительного электрофореза: сила тока — 3—5 мА, напряжение — 200—400 В, продолжительность — около 60 мин.

Вертикальный электрофорез в пластине

Электрофорез белков в пластине полиакриламидного геля имеет ряд преимуществ по сравнению с электрофорезом в трубочках. Использование тонких пластин облегчает эффективное отведение тепла при электрофорезе. Процесс фиксации, прокраски и отмывания занимает значительно меньше времени. Использование одной пластины позволяет

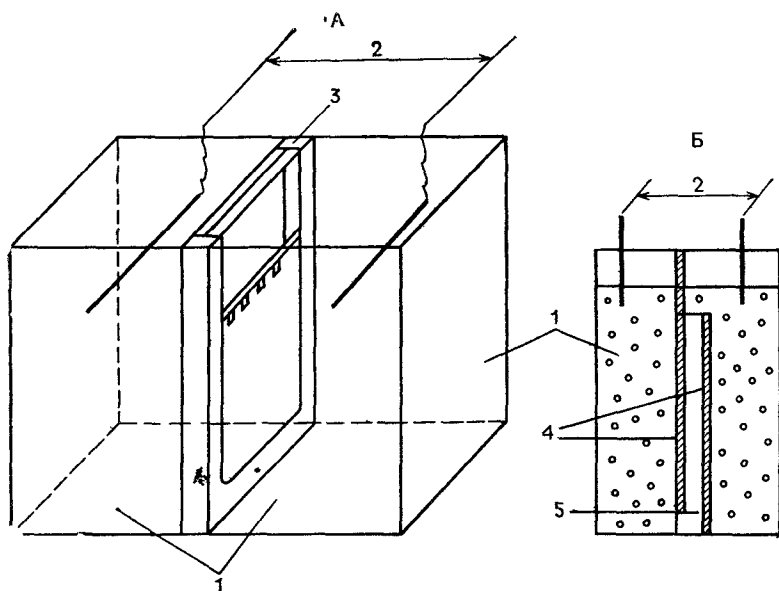


Рис. 11. Схема прибора для вертикального электрофореза в пластинках полиакриламидного геля.

А — общий вид прибора, Б — поперечное сечение гелевой ячейки-кассеты. 1 — электродные камеры, заполненные буферным раствором; 2 — электроды; 3 — гелевая ячейка-кассета; 4 — стекла, образующие стенки ячейки; 5 — пластина полиакриламидного геля

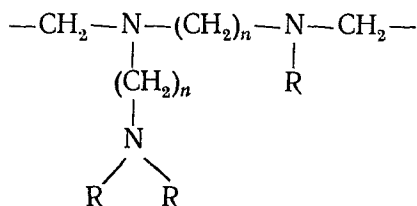
в абсолютно идентичных условиях проводить разделение сразу нескольких (10—13) проб белка. На пластины можно наносить меньше белка, чем на цилиндрические гели. В зависимости от используемого красителя, а также от природы белка на пластине полиакриламида удастся обнаружить от 5 до 50 мкг белка.

В приборе, изготовляемом производственным объединением «Хийу Калур» Эстонской ССР, гель полимеризуют в специальной гелевой ячейке-кассете (рис. 11, А, 3). Для ее создания в выполненную из пластика рамку вставляют два стекла. Зазор между стеклами можно регулировать специальными прокладками толщиной 1, 2 или 3 мм, задающими толщину пластины полиакриламида. Стекла плотно вставляют в рамку и ячейку герметизируют с помощью специальных прокладок из силиконовой резины. В зазор между стеклами заливают смесь для полимеризации (см. с. 95). Если разделение проводят в геле только одного типа, раствор заливают в кассету доверху и сразу же между стеклами вставляют специальную пластинку — «гребенку». Зубцы ее образуют углубления на поверхности геля, в которые впоследствии вносят образцы белка. Если в работе используют два типа гелей (концентрирующий и разделяющий), то в кассету сначала на высоту 85—95 мм от дна заливают раствор для полимеризации разделяющего геля. На него осторожно накладывают воду и кассету оставляют в вертикальном поло-

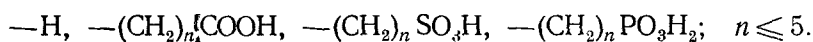
железа до полимеризации геля. Воду удаляют, на поверхность разделяющего геля наносят смесь для полимеризации концентрирующего геля до полного заполнения кассеты и вставляют шаблон-гребенку. После окончания полимеризации удаляют одну из герметизирующих прокладок (см. инструкцию к прибору), вынимают из геля шаблон-гребенку и вставляют ячейку в прибор. Контакт между электродными отсеками (I) в приборе (они расположены с двух сторон от гелевой ячейки) осуществляется через пластинку полиакриламида, верхний конец которой контактирует с правым электродным отсеком, а нижний конец — с левым электродным отсеком (рис. 11, Б). После сборки прибора электродные камеры заполняют буферным раствором, а в лунки-колодцы на поверхности геля тонко оттянутым капилляром из стекла или из тefлоновой или полиэтиленовой трубочки наносят образцы белка. Необходимо, чтобы плотность образцов белка была выше плотности буферного раствора. Поэтому раствор белка готовят на 10%-ном растворе сахарозы. После нанесения образца прибор подключают к источнику тока и проводят электрофорез. После того как маркерный краситель, вносимый с образцом белка, достигнет нижней границы пластины, источник питания выключают, сливают электродные буферы и вынимают гелевую ячейку. Из ячейки вынимают уплотнительные прокладки, аккуратно отделяют одно стекло от другого и переносят пластину геля в плоскую кювету или пластмассовую коробку. Для фиксации, прокраски и обесцвечивания используют те же растворы, как и в случае цилиндрических гелей. Время прокраски уменьшают в два раза.

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Изоэлектрофокусирование — один из вариантов электрофоретического разделения макромолекул. Принцип метода состоит в следующем. Если на колонку, вдоль длины которой сформирован градиент pH, нанести образец белка, а потом подключить концы колонки к источнику тока, то молекулы белка будут двигаться по колонке до тех пор, пока не достигнут той области, где величина pH окажется равной величине изоэлектрической точки белка. Для создания градиента pH используются сложные смеси амфотерных соединений, по-разному обозначаемые фирмами-изготовителями (например, амфолины, фармалиты, сервали-ты и т. д.). Эти соединения обычно имеют небольшую молекулярную массу (400—800 Да) и получаются путем химического синтеза. Общая формула некоторых типов амфолитов может быть представлена в виде:



На месте R могут стоять:



Величина pK амфолитов варьирует от 2,5 до 11. Изоэлектрические точки некоторых из них отличаются друг от друга не более чем на 0,05 единиц pH. Смесь амфолитов помещают в колонку, заполненную

крупнопористым гелем или концентрированным раствором сахарозы. Один конец колонки погружают в разбавленный раствор щелочи, куда опускается один электрод (катод), а другой конец колонки помещают в разбавленный раствор кислоты, куда опускается другой электрод (анод). В начале все амфолиты распределены равномерно по объему колонки. При подключении электрического тока амфолиты, имеющие изоэлектрические точки при кислых значениях pH и располагающиеся у катода, депротонируются, приобретают большой отрицательный заряд и начинают двигаться к аноду. В то же время амфолиты, расположенные около анода и имеющие изоэлектрические точки при щелочных значениях pH , протонируются, приобретают положительный заряд и движутся к катоду. Значения pI используемых растворов щелочи и кислоты соответственно выше и ниже величин pI самых «щелочных» и самых «кислых» амфолитов. Вследствие этого по мере приближения к электродам все амфолиты проходят такую область геля, где pH оказывается равным изоэлектрической точке амфолитов. В этой области суммарный заряд амфолитов становится равным нулю и они перестают передвигаться к электродам. Накопление амфолитов, обладающих одним и тем же pI , в одной зоне приводит к созданию мощного буфера, способного поддерживать pH , равный изоэлектрической точке этой группы амфолитов. После того как все амфолиты достигнут соответствующих областей, на геле создается устойчивый градиент pH , крутизна, форма и стабильность которого определяются концентрацией и диапазоном pI используемых амфолитов, а также составом и концентрацией приэлектродных растворов. Если формирование градиента pH происходит в присутствии белка, суммарный заряд молекулы которого определяется соотношением кислых и щелочных аминокислот, или если белок наносят на уже сформированный градиент pH , то молекулы белка ведут себя так же, как и молекулы амфолитов. Вследствие этого после окончания процесса изоэлектрофокусирования белки концентрируются в виде очень узких зон, положение которых определяется изоэлектрической точкой белка.

При изоэлектрофокусировании белок можно наносить на любую точку предварительно сформированного градиента pH или формировать градиент pH в присутствии белка. В начальные периоды фокусирования электрический ток имеет достаточно большую величину. По мере фокусирования он уменьшается и к концу фокусирования достигает какой-то минимальной величины. Охлаждение обеспечивает получение более четких и узких зон белка. Увеличение времени электрофокусирования не сопровождается размыванием белковых зон.

Реактивы:

1. Раствор для приготовления геля. Акриламид (24 г) и метиленбисакриламид (1 г) растворяют в воде и доводят объем водой до 100 мл. Раствор хранят в темной склянке на холоде. При изоэлектрофокусировании необходимо использовать высокоочищенные препараты всех реактивов, особенно акриламида.

Внимание! Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках!

2. Амфолиты — 20- или 40%-ный растворы.
3. Персульфат аммония — 40%-ный раствор (свежеприготовленный).
4. ТЕМЕД — 10%-ный раствор.
5. Сахароза — 40%-ный раствор.
6. NaOH — 0,5 М раствор и H_3PO_4 — 0,5 М раствор.

растворе HClO_4 .

Необходимую навеску красителя суспендируют в нужном объеме 3,5%-ного раствора HClO_4 и перемешивают на магнитной мешалке в течение часа при комнатной температуре, затем фильтруют через бумажный фильтр и хранят при комнатной температуре.

8. Белки с известными изоэлектрическими точками: сывороточный альбумин (pI 4,6), овальбумин (pI 4,6), каталаза (pI 5,7), гемоглобин (pI 6,8—7,0), РНКаза (pI 7,8), α -химотрипсин (pI 8,1), папаин (pI 9,0), лизоцим (pI 10,5), цитохром *c* (pI 10,0).
9. Красители с известными изоэлектрическими точками: патентованный синий V (pI 3,0), малахитовый зеленый FCF (pI 3,05 и pI 3,85), метиловый синий (pI 3,60), конго красный (pI 5,8).

Для приготовления 2 мл геля, достаточного для заполнения одной трубки при электрофокусировании, смешивают 0,4 мл раствора № 1, 0,1 мл 40%-ного раствора амфолитов широкого диапазона pH (pH 3—9 или pH 2—11), 0,5 мл раствора сахарозы (раствор сахарозы можно заменить водой) и 0,9 мл воды. Смесь помещают в колбу для деаэрирования. После 5—10-минутного деаэрирования в полученную смесь добавляют 0,1 мл раствора исследуемого белка или белка с известной изоэлектрической точкой. Концентрация белка — 0,3—1 мг/мл. В качестве стандартов с известными изоэлектрическими точками можно использовать перечисленные выше красители. В этом случае вместо белка в образец вносят 0,1 мл водного раствора красителя (или смесь нескольких красителей) с концентрацией 0,03—0,08 мг/мл. К полученному раствору (2 мл) добавляют 10 мкл раствора ТЕМЕД (конечная концентрация 0,05%) и 2 мкл раствора персульфата аммония (конечная концентрация 0,04%). Полученную смесь немедленно заливают в трубочки с внутренним диаметром 3—5 мм и длиной 8—10 см, установленные в специальной подставке (см. рис. 10). Сверху на этот раствор осторожно настилают воду. После окончания полимеризации трубочки вставляют в верхнюю электродную камеру прибора для электрофореза (см. рис. 10). Обычно используют полиакриламидные гели низкой концентрации (5—6%), которые имеют тенденцию выскальзывать из трубки. Чтобы этого не произошло, нижний конец трубки закрывают целлофановой мембраной, которую закрепляют на трубке с помощью резинового кольца. В верхнюю камеру прибора заливают 0,5 М раствор NaOH , в нижнюю камеру — 0,5 М раствор H_3PO_4 . Вставляют электроды так, чтобы в верхнем сосуде располагался катод, а в нижнем — анод, и подключают к источнику питания. Сначала ток на каждую трубку должен составлять 1 мА. По мере фокусирования из-за возрастания сопротивления напряжение увеличивают. Когда оно достигнет 250—300 В, источник питания переключают в режим стабилизации напряжения и поддерживают его равным 300 В в течение 3—5 ч. Об окончании фокусирования судят по миграции и концентрированию зон красителей с известными изоэлектрическими точками или по движению зон окрашенных белков (цитохром *c*, гемоглобин, каталаза). Изоэлектрофокусирование проводят на холоде.

Образцы белка также можно наносить на предварительно полимеризованные гели. После полимеризации гели можно подвергнуть предварительному фокусированию (1 мА на трубку, 30—60 мин). Затем источник тока отключают и на поверхность геля настилают 30—80 мкл образца белка (30—100 мкг белка в расчете на одну зону), растворен-

ного в смеси, содержащей 20% сахарозы и 2% амфолитов, предварительно оттитрованных до pH 8—9. Далее проводят электрофокусирование, как это было описано выше. Такой метод нанесения образца можно использовать и при фокусировании с использованием вертикально расположенных пластин полиакриламида (с. 97).

После окончания электрофокусирования гели извлекают из трубок. Часть гелей прокрашивают для выявления белковых зон, а один или два геля используют для измерения градиента pH, сформированного в ходе изоэлектрофокусирования. Существует много вариантов окраски гелей. Один из них состоит в том, что гели погружают на 1 ч в 0,075%-ный раствор кумасси G-250 в 3,5%-ном растворе HClO_4 . Затем гели 3—5 раз промывают 3,5%-ным раствором HClO_4 и в нем же хранят. Белки выявляются в виде синих полос на слабо-желтом фоне. Для определения pH на гелях существует несколько методов. Градиент pH можно определить, измерив положение маркеров-красителей или маркеров-белков с известными изоэлектрическими точками. Другой способ состоит в том, чтогель разрезают поперек на диски толщиной 2—4 мм. Эти диски помещают в пробирки и заливают минимальным объемом (1—3 мл) прокипяченной бидистиллированной воды. Пробирки продувают инертным газом, закрывают пробками со шлифом и оставляют при комнатной температуре на 10—12 ч. За это время амфолиты диффундируют из геля, поэтому, измерив pH в каждой пробирке, можно определить градиент pH на геле. Зная градиент pH и положение белка на геле, определяют изоэлектрическую точку исследуемого белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование М., 1981.
2. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М., 1982.
3. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М., 1983.
4. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976.
5. Прусик З. Электромиграционные методы//Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Под ред. О. Микеша. М., 1982. Т. 2. С. 679.
6. Скоупс Р. Методы очистки белков. М., 1985.
7. Хроматография. Практическое приложение метода/Под ред. Э. Хефтмана. М., 1986.
8. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971.
9. Паспорт-инструкция к использованию аппарата для вертикального гель-электрофореза. Таллинн, 1984.
10. Ригетти П. Изоэлектрическое фокусирование. Теория, методы и применение. М., 1986.
11. Электрофоретические методы анализа белков/Под ред. Р. К. Салеева, П. Д. Решетова. Новосибирск, 1981.
12. Успенская В. Д. Электрофорез белков в крахмальном блоке//Современные методы в биохимии/Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1964. Т. 1. С. 87.
13. Гурвич А. Е. Электрофорез сыворотки на бумаге//Современные методы в биохимии/Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1964. С. 110.
14. Якубке Х. Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1985.
15. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М., 1980.
16. Методы практической биохимии/Под ред. Б. Уильямса, К. Уилсона. М., 1978.

2. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ

По механизмам разделения хроматографию подразделяют на адсорбционную (газовую или жидкостную), осадочную, ионообменную, распределительную, гель-фильтрационную (гель-хроматографию) и био-

специфическую (афинную); по форме проведения — на колоночную, хроматографию на бумаге и в тонком слое. Для фракционирования белков применяется главным образом хроматография на колонках.

ОБЩИЕ ПРИЕМЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ НА КОЛОНКАХ

Простейшее устройство для хроматографического разделения на колонках изображено на рис. 12. Колонки (рис. 13, 1) — полые стеклянные трубки, размер которых зависит от целей работы и способа разделения. В основание колонки впаивают пористую стеклянную пла-

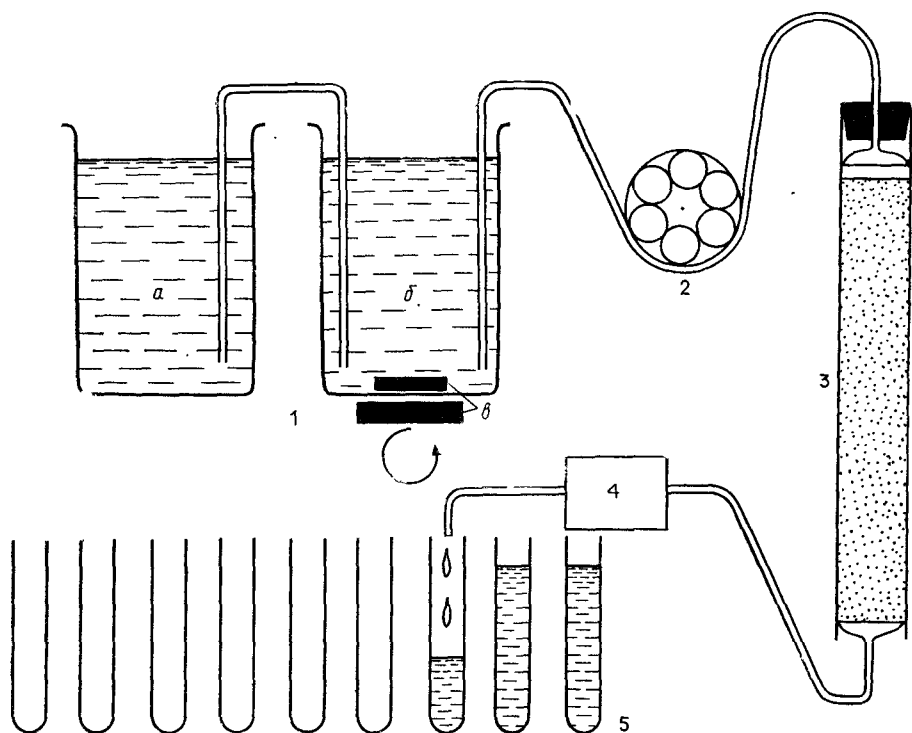


Рис. 12. Схема устройства для колоночной хроматографии.

1 — прибор для создания линейного градиента (*a* — сосуд с раствором высокой концентрации; *б* — сосуд-смеситель; *в* — магнитная мешалка); 2 — перистальтический насос; 3 — колонка; 4 — УФ-детектор; 5 — коллектор фракций

стинку или перфорированный диск (2). Необходимо следить за тем, чтобы «мертвое» пространство под диском, между ним и основанием колонки, а также внутренний диаметр шлангов, по которым выходящий из колонки элюат поступает в коллектор фракций (рис. 12, 5), было минимальным. В противном случае происходит смешивание уже разделенных веществ. Коммерческие колонки (рис. 13, Б) снабжены специальными приспособлениями — концевыми адапторами переменной длины (10), которые позволяют регулировать длину колонки и сводят к минимуму перемешивание элюируемых фракций.

Заполнение колонки имеет большое значение для успешного разделения исследуемых веществ. Колонку укрепляют строго вертикально, закрывают нижний кран (зажим) (рис. 13, 4) и наливают в нее примерно на 1/3 ее объема дистиллированной воды. Энергичными движениями стеклянного поршня (рис. 13, 8) освобождают пространство под

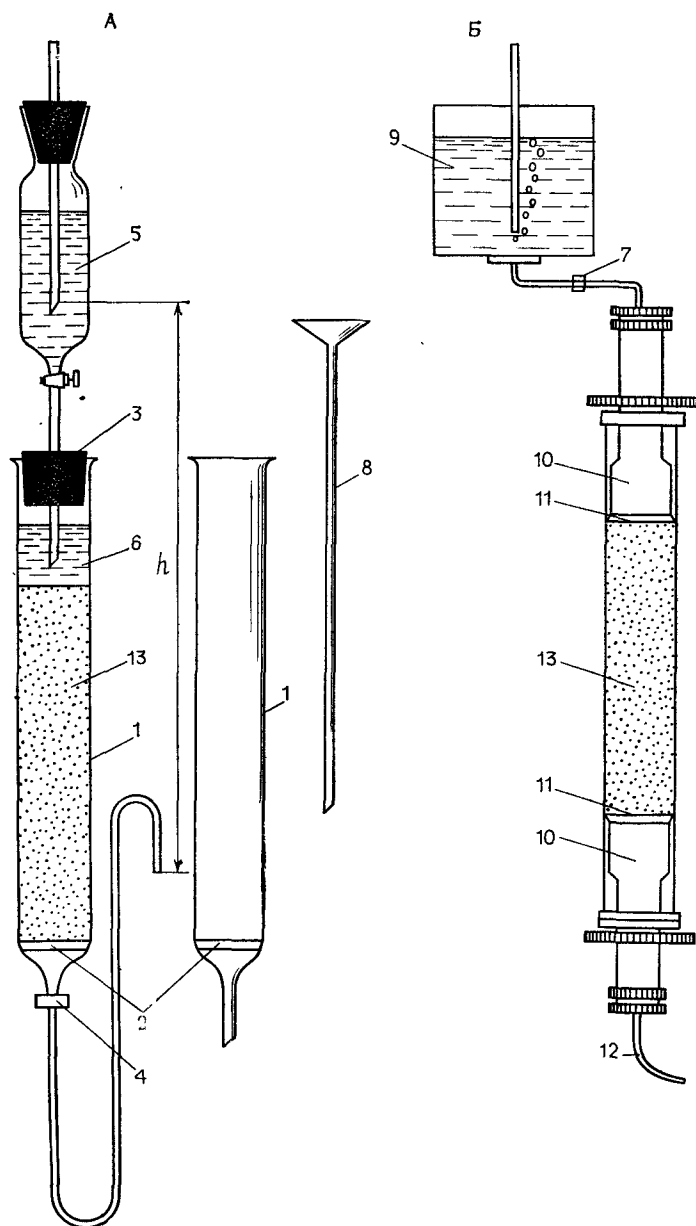


Рис. 13. Хроматографические колонки упрощенного (А) и усложненного (Б) варианта.

1 — стеклянная колонка; 2 — перфорированный диск; 3 — пробка со стеклянной трубкой; 4, 7 — кран-зажим; 5, 9 — верхний резервуар; 6 — буферный раствор над гелем; 8 — стеклянный поршень; 10 — адапторы; 11 — сетка из нейлона; 12 — капиллярный шланг, соединенный с регистрирующим устройством и (или) коллектором фракций

диском от пузырьков воздуха. На диск с помощью поршня помещают кружок фильтровальной бумаги, по размерам точно соответствующий внутреннему диаметру колонки. Поршень осторожно вынимают, следя за тем, чтобы в колонку не попали пузырьки воздуха. Через воронку или по палочке наливают в колонку густую, тщательно взмученную взвесь используемого сорбента (смолы или геля) так, чтобы жидкость стекала по стенке колонки и не увлекала в свою толщу пузырьков воздуха. Суспензии дают осесть, через несколько минут открывают кран и продолжают наполнение колонки, постепенно подливая следующие порции взвеси. Во избежание слишком сильного уплотнения сорбента заполнения колонки производят при небольшом давлении (особенно важно следить за этим при работе с гелем сефадекса). Давление определяет величина h (рис. 13, А) — разница между уровнем жидкости над сорбентом в колонке (или присоединенном к ней верхнем резервуаре) и положением конца шланга, по которому элюат вытекает из колонки. Необходимо следить за тем, чтобы наполнение колонки было равномерным.

Заполнив колонку до нужной высоты, закрывают нижний кран (зажим) и дают суспензии осесть, не допуская «высыхания» наполнителя в колонке (для этого над верхним слоем сорбента всегда должен находиться слой растворителя). Следят также за тем, чтобы верхний слой наполнителя имел гладкую горизонтальную поверхность. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя при внесении в колонку образца над ним иногда помещают кружок фильтровальной бумаги или поролона. Колонку закрывают пробкой с отводом или со стеклянной трубкой и присоединяют к резервуару (рис. 13, Б), содержащему элюирующий раствор. Для поддержания постоянного давления и сохранения постоянной скорости тока жидкости через колонку используют склянку Мариотта или насосы различных конструкций.

Внесение образца в колонку можно производить несколькими способами. Самый простой из них заключается в следующем: жидкость с поверхности наполнителя осторожно удаляют, оставляя слой в 1—2 мм; при помощи пипетки осторожно вносят образец и, открыв нижний кран, дают ему впитаться; остатки образца над сорбентом смывают небольшой порцией элюента; после того как он впитается поверхностью наполнителя, добавляют новые порции элюирующего раствора, создавая слой в 5—10 см. Другой способ внесения образца, при котором избыток жидкости не удаляют из колонки, заключается в увеличении плотности раствора образца путем добавления сахарозы до концентрации 0,5 М. Раствор образца при этом спускают под слой растворителя и он быстро впитывается в верхний слой наполнителя.

После нанесения образца колонку соединяют с верхним резервуаром, устанавливают необходимую скорость протекания элюирующего раствора путем изменения рабочего давления и начинают сбор фракций с помощью коллектора. Собирать фракции элюата необходимо с момента нанесения образца на колонку. Фракции можно собирать в пробирку по объему (с помощью сифонов), по определенному количеству капель или через определенные промежутки времени.

Элюирование разделяемых веществ с колонок, как правило, проводят растворами, изменяя рН, ионную силу (концентрацию) или оба показателя одновременно. При этом градиент рН и ионной силы может быть ступенчатым или непрерывным (плавным). При создании ступенчатого градиента пользуются серией буферных растворов, пропускаемых через колонку последовательно один за другим. При этом виде элюции каждый из элюирующих буферных растворов пропускают че-

рез колонку до тех пор, пока концентрация белка в вытекающем из колонки элюате, пройдя через максимум, не снизится почти до исходных фоновых значений.

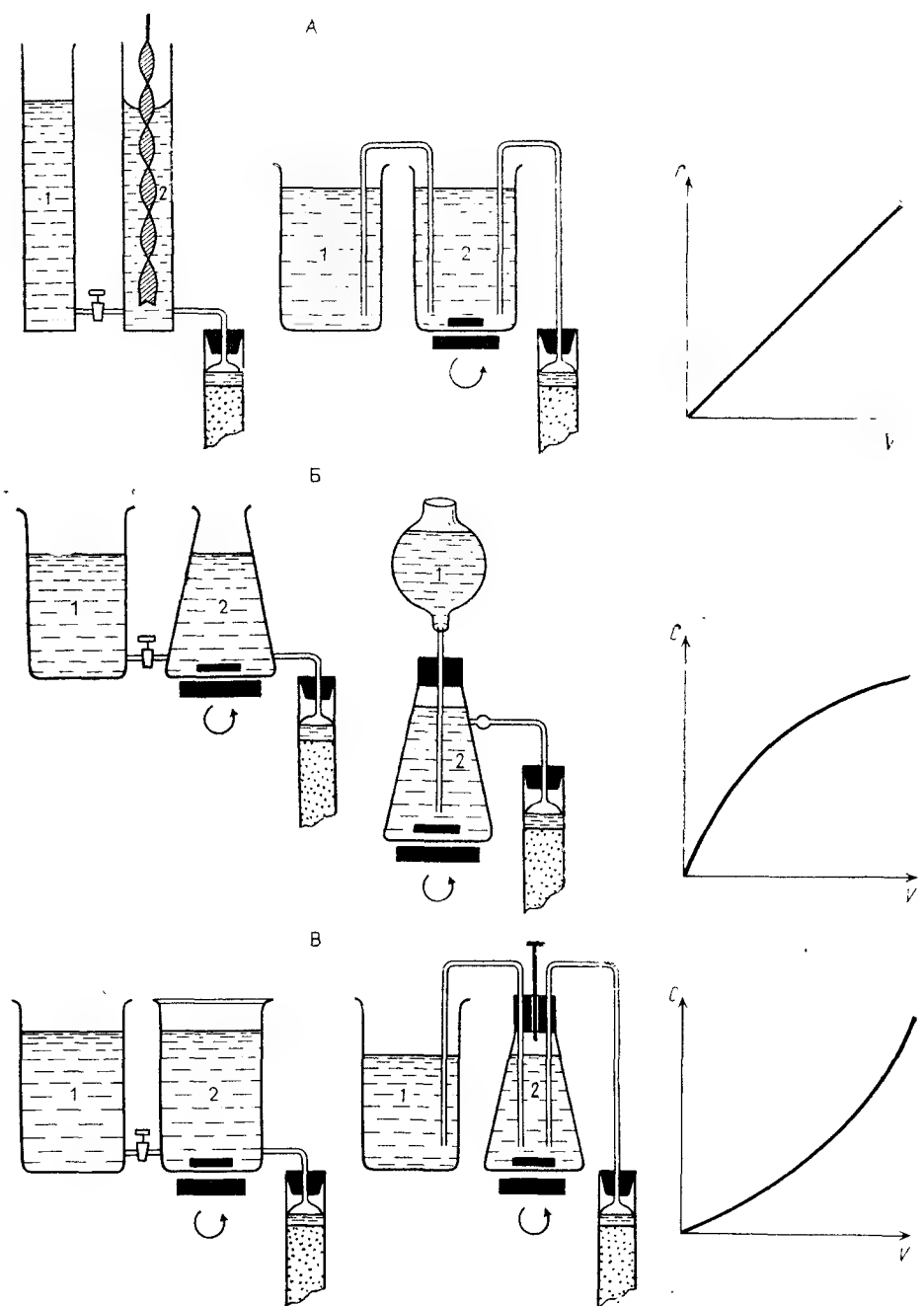


Рис. 14. Приборы для создания градиента концентрации:
 А — линейного, Б — выпуклого, В — вогнутого (объяснения в тексте)

При непрерывном градиенте² элюции изменение ионной силы и (или) рН элюирующего раствора происходит постепенно, по линейной или нелинейной зависимости от объема протекающей жидкости. Линейное изменение ионной силы или рН элюирующего раствора происходит тогда, когда эти параметры изменяются пропорционально объему протекающей жидкости. Получить линейный градиент можно с помощью прибора, состоящего из двух соединенных между собой одинаковых сосудов, установленных на одном уровне (рис. 14, А). В одном сосуде (1) находится буферный раствор со значением ионной силы (или рН), которое должно быть достигнуто к концу опыта, в другом смесителе (2), из которого раствор поступает непосредственно в колонку, вначале находится равный объем исходного буферного раствора. Часто применяют «выпуклый» или «вогнутый» градиенты, при которых ионная сила раствора увеличивается или уменьшается соответственно по экспоненциальной зависимости. Форму этих градиентов легко получить с помощью простого устройства, изображенного на рис. 14, Б, В.

МЕТОД ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

Гель-хроматография (гель-фильтрация) — фракционирование смеси компонентов по размерам молекул путем прохождения их через гели с определенной величиной пор.

Раствор, содержащий смесь двух и более веществ, отличающихся по размеру молекул, а следовательно, и по молекулярной массе, вносят в колонку, заполненную гелем с сетчатой структурой и уравновешенную буферным раствором. Наибольшей скоростью продвижения по колонке обладают компоненты раствора, размеры молекул которых больше пор геля. Такие компоненты не проникают в гранулы гелевой фазы и выходят из колонки первыми. Более мелкие молекулы, способные проникать внутрь геля, непрерывно обмениваются между жидкими фазами внутри и вне геля и продвигаются по колонке значительно медленнее. Находящиеся в растворе самые маленькие частицы (например, неорганические соли) выходят из колонки последними. На этом принципе основаны методы фракционирования белков и других полимеров, их обессоливание, определение молекулярной массы, замена одних буферных растворов другими и др.

Наиболее широкое распространение среди носителей для гель-хроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на основе декстрана (сефадексы, сефакрилы, молселекты), полиакриламида (биогели Р, акрилексы) и агарозы (сефарозы, биогели А) и др. Набухая в воде, они образуют гели.

Студентам предлагается провести разделение смеси белков на колонке с сефадексом.

Сефадексы — продукты взаимодействия полисахарида декстрана с эпихлоргидрином. Они устойчивы к органическим растворителям, растворам щелочей и разбавленных кислот (до 0,1 н.). Рабочий диапазон рН составляет 2—10. Гели декстрана подвержены действию сильных окислителей, вызывающих образование карбоксильных групп.

Номера в маркировке сефадексов характеризуют их пористость. Выбор определенной марки сефадекса определяется молекулярной массой исследуемого белка (чем больше соответствие размеров молекул и величины пор, тем выше селективность), а степень зернения — поставленной задачей. Для обессоливания растворов белков и их концентри-

² Используемый в литературе термин «градиентная элюция» относят лишь к такому виду градиента.

рования обычно используют сефадексы G-25 и G-50 (грубый или средний). При разделении же смеси белков пользуются сефадексами тонкого или сверхтонкого зернения. Чем мельче частицы геля, тем эффективнее происходит разделение, но тем меньше скорость протекания раствора через колонку.

При работе сефадексам дают предварительно набухнуть в избытке растворителя. Время и температура набухания указаны в соответствующих таблицах.

Реактивы:

1. Натрий-фосфатный или калий-фосфатный буфер — 0,05 М растворы, содержащие 0,05 М KCl, pH 6,5.
2. Сефадекс G-100.
3. Белки с определенной молекулярной массой (Да): яичный альбумин (45 000), бычий сывороточный альбумин (68 000), рибонуклеаза из поджелудочной железы (12 700), цитохром c (13 000).
4. Голубой декстран (м. м. $\approx 2\,000\,000$ Да).
5. Сахароза.

Разделение белков на колонках с сефадексом. Сухой сефадекс суспендируют в 200-кратном объеме воды и оставляют стоять на 48 ч при комнатной температуре для полного набухания. Набухание можно ускорить, проводя его на кипящей водяной бане в течение 5 ч.

Колонку (размером $1,5 \times 50$ см)³ подготавливают так, как описано на с. 103. В нее вносят относительно густую суспензию полностью набухшего геля. Для предотвращения образования пузырьков воздуха в слое геля в колонке суспензию сефадекса перед заполнением колонки можно деаэрировать с помощью водоструйного насоса в колбе Бунзена или вносить его в колонку при температуре, значительно превышающей комнатную (50—60 °C). Сефадексу в колонке дают отстояться, затем с целью уравнивания и достижения постоянной высоты столба геля колонку промывают 3—5 объемами буферного раствора. Гидростатическое давление для сефадекса G-100 не должно превышать 50 см: $h = 20\text{—}50$ см (давление при разделении образца и при заполнении колонки должно быть одинаковым). Для проверки равномерности заполнения через колонку можно пропустить раствор окрашенного белка, например цитохрома c или голубого декстрана. При этом окрашенная зона должна быть компактной и двигаться по колонке параллельно ее основанию.

Исследуемую белковую смесь растворяют в буферном растворе в объеме 1 мл⁴ (по 2—4 мг каждого белка) и вносят в колонку. Нанесение пробы на колонку проводят, как описано на с. 104, увеличив плотность раствора добавлением сахарозы до 0,5 М.

Перед использованием колонки определяют ее свободный объем (V_0). Для этого через колонку пропускают 1 мл (1 мг/мл) раствора голубого декстрана в 0,5 М растворе сахарозы. В качестве растворителя как для голубого декстрана, так и для исследуемых белков применя-

³ Для аналитических целей рекомендуется отношение длины к диаметру колонки 10:1 или 20:1. При обессоливании используют более короткие и широкие колонки.

⁴ Объем наносимого образца при аналитическом разделении должен быть по возможности небольшим (2—3% от общего объема колонки — V_t). При обессоливании его можно увеличить до 20—30%. Рекомендуемая концентрация белка — 1%. При анализе высокомолекулярных белков концентрацию уменьшают до 0,1—0,5%.

ют тот же буферный раствор, которым уравновешена колонка. Им же элюируют белки с колонки после нанесения анализируемой смеси. Следует отметить, что поскольку положительно заряженные частицы могут частично взаимодействовать с сефадексом (за счет имеющихся карбоксильных групп), для элюции обычно используют растворы с ионной силой выше 0,02. Если исследуемые белки после гель-хроматографии надлежит лиофилизировать, для элюции используют летучие буферные растворы (аммоний бикарбонатный, ацетатный, формиатный и др.).

Вытекающий из колонки буферный раствор собирают в пробирки порциями по 1—3 мл. Регистрацию объема элюата, прошедшего через колонку, начинают с момента нанесения образца на колонку. Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически при 280 нм. Оптическую плотность растворов, содержащих рибонуклеазу, определяют при 230 нм, голубой декстран — при 650 нм, цитохром *c* — при 412 нм. После окончания анализа колонку промывают несколькими объемами буферного раствора. Строят профиль элюирования отдельных белковых фракций. Для этого вычерчивают график, на горизонтальной оси которого откладывают номера пробирок (фракций) или объем прошедшей через колонку жидкости, а на вертикальной оси — величины оптической плотности фракций.

Регенерация и хранение сефадекса. Многократное использование колонки с сефадексом приводит к замедлению протекания жидкости через нее. В этом случае гель извлекают из колонки, отмучивают его от мелких частиц и колонку набивают заново.

Сефадексы можно хранить в виде суспензии или в сухом виде. Суспензию сефадекса следует хранить в холодильнике в присутствии антисептиков: 0,02%-ного азида натрия, мертиолата или хлороформа. Для перевода геля в сухое состояние сефадекс сначала промывают водой для удаления солей, а затем выдерживают несколько минут с 2-кратным объемом 50%-ного этанола; после фильтрования на воронке Бухнера сефадекс выдерживают с 2-кратным объемом 96%-ного этанола. Обработку последним повторяют несколько раз. Осадок высушивают в термостате при 60—80 °С.

МЕТОД ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В основе разделения соединений методом ионообменной хроматографии лежат реакции ионного обмена между анализируемыми соединениями и сорбентами-ионитами, имеющими в своем составе ионизируемые группировки.

Сильные иониты, функциональные группы которых образованы сильными кислотами или основаниями, могут быть ионизированы полностью во всем диапазоне рабочих значений pH (3—11). Слабые иониты, функциональные группы которых образованы слабыми кислотами или основаниями, могут быть ионизированы не полностью и лишь в ограниченной области значений pH.

При фракционировании белков методом ионообменной хроматографии большое внимание уделяют выбору ионообменника (природе матрицы и емкости ионита) и буферного раствора, при котором осуществляется сорбция белков (величине pH и ионной силы, природе буфера и буферной емкости).

При работе с белками в качестве сорбентов используют иониты, обладающие высокой степенью гидрофильности.

Белки могут быть разделены как на катионитах, так и на анионитах. Выбор типа ионита определяется изоэлектрическими точками хро-

матографируемого материала и устойчивостью белка в определенной зоне значение рН.

Эффективная сорбция белков происходит при значениях рН, отстоящих не менее чем на единицу от pI . В области $pH < pI - 1$ белки можно хроматографировать на катионитах, а в области $pH > pI + 1$ — на анионитах. Изменение рН в направлении к ИЭТ способствует десорбции белков. При работе с белками используют буферные растворы с низкой ионной силой, но высокой буферной емкостью. Для этого пользуются буферными растворами, pK которых отстоит от величины рН, используемой в эксперименте, не более чем на 0,3—0,5 единиц рН. Хроматографию на анионитах ведут в таких системах, где диссоциируемым компонентом является катион (буферы: трис, пиридин, имидазол и др.), а для катионитов диссоциируемым компонентом является анион (ацетатный, фосфатный, бикарбонатный буфер и др.).

При ионообменной хроматографии смесь белков сорбируется в верхней части колонки и затем вытесняется веществами, уменьшающими их сорбцию на ионите. Понижение сорбции осуществляют повышением ионной силы раствора и (или) изменением его рН. Изменение рН и ионной силы элюирующего буферного раствора можно проводить путем создания ступенчатой или градиентной элюции (с. 104).

Подготовка ионообменников к работе. Использованию ионитов для хроматографического разделения белков предшествует их предварительная обработка. Иониты промышленного изготовления после набухания, во-первых, фракционируют по размеру частиц (однородность частиц сорбентов по размеру — одно из важных условий успешной хроматографии) и, во-вторых, подвергают «циклизации» — переводу их из одной формы в другую. Катиониты переводят из Na^+ -формы в H^+ -форму или наоборот, а аниониты — из Cl^- -формы в OH^- -форму или наоборот. В процессе такой обработки стабилизируется структура ионита и функциональные группы становятся более доступными. Одновременно ионит освобождается от примесей.

Навеску порошка сорбента суспендируют в 50-кратном и более объеме дистиллированной воды, перемешивают и оставляют набухать на ночь. Слой жидкости над ионообменником декантируют, снова заливают дистиллированной водой, перемешивают и через 2—2,5 ч верхний слой жидкости декантируют вместе с неосевшими мелкими частицами. К оставшемуся осадку приливают 50-кратный объем 0,5 н. $NaOH$, тщательно перемешивают и через час ионит фильтруют через воронку Бухнера⁵. Осадок на воронке промывают водой до рН 7,0. Затем ионит перемешивают в 50-кратном объеме 0,5 н. HCl и через 30—60 мин (время обработки ионита кислотой не должно быть большим) отмывают дистиллированной водой примерно до рН 5,0. На следующем этапе в случае анионитов, например ДЭАЭ-целлюлозы, сорбент повторной обработкой щелочью переводят в OH^- -форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном объеме 0,5 н. $NaOH$, перемешивают и через час отмывают дистиллированной водой до рН воды. В случае катионитов, например КМ-целлюлозы, сорбент повторной обработкой кислотой переводят в H^+ -форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном избытке 0,5 М раствора HCl в течение 30—60 мин. После фильтрования сорбент отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока рН промывной жидкости не достигнет рН воды.

⁵ На всех стадиях обработки ионита фильтрование может быть заменено декантацией или центрифугированием.

Для освобождения от мелких и крупных частиц ионит суспендируют в цилиндре на 1 л, перемешивают, отстаивают 20—30 мин и верхний слой жидкости с неосевшими мелкими частицами декантируют. Эту операцию повторяют несколько раз (5—6), пока жидкость над осадком будет свободной от мелкой взвеси. Чтобы освободиться от крупных частиц, ионит суспендируют в воде, перемешивают и через ~1 мин суспензию сливают в другой цилиндр.

После описанной обработки ионит уравнивают буферным раствором, в котором осуществляют сорбцию белков на ионообменнике (исходный буферный раствор). Эту процедуру можно проводить как на колонке, так и вне ее. Обработку исходным буферным раствором осуществляют до тех пор, пока не произойдет выравнивания рН элюата на выходе из колонки (или жидкости, в которой суспендируют ионит) с рН исходного буферного раствора. Уравнивание — процесс медленный. Для его ускорения ионит можно сначала обработать раствором того же состава, что и исходный, но с большей концентрацией, а после достижения нужного значения рН уравнивание продолжают исходным раствором. Другой способ уравнивания заключается в том, что ионит суспендируют в исходном буферном растворе до получения достаточно жидкой суспензии. Добавлением раствора, содержащего соответственно кислый или основной компонент исходного буфера, доводят рН (на рН-метре) до нужного значения. Затем сорбент уравнивают исходным буферным раствором. Во всех случаях конечное состояние равновесия (величину рН) необходимо контролировать.

Регенерация. Ионообменники можно использовать многократно. Поэтому по окончании работы их следует регенерировать. Для этого к использованному сорбенту добавляют 30-кратный объем 0,2—0,5 н. раствора NaOH, перемешивают до получения однородной суспензии и фильтруют на воронке Бухнера. Обработку щелочью проводят дважды. После этого ионит отмывают водой до нейтральной реакции фильтра. Регенерированный ионообменник уравнивают соответствующим буферным раствором.

Хранение. Ионообменники на основе целлюлозы и декстрана можно хранить во влажном состоянии непродолжительное время. Аниониты лучше хранить в солевой форме (не в OH⁻-форме), катиониты хранят в солевой форме и в H⁺-форме. При хранении набухших ионообменников к ним добавляют антисептики (с. 108); при добавлении толуола (нескольких капель на литр) следует помнить, что толуол поглощает при 280 нм, а растворимость его в некоторых буферах, например в трис-буфере, достаточно высока.

Подготовка и заполнение колонки. Колонку заполняют суспензией ионита в элюирующем буферном растворе (с. 103). Заполнение колонки можно проводить и суспензией ионита в воде и лишь после уплотнения слоя сорбента уравнивать колонку элюирующим буферным раствором. Над верхним слоем сорбента всегда должен оставаться слой жидкости не менее 2 см.

Подготовка исследуемого материала. Раствор белка, наносимый на колонку, должен иметь тот же состав и те же значения рН и ионной силы, что и исходный буферный раствор, которым уравновешен ионообменник. Образец переводят в исходный буферный раствор, подвергая его предварительно диализу или гель-хроматографии. Если объем пробы, предназначенный для ионообменной хроматографии, невелик, образец можно развести исходным буферным раствором. Нерастворимые компоненты удаляют центрифугированием или фильтрованием. Если

исследуемый белок связывается с ионообменником прочно, объем наносимого белкового раствора значения не имеет, если он связывается слабо, наносимый объем должен быть по возможности небольшим.

Элюция белков с колонки. Скорость протекания элюента по колонке при ионообменной хроматографии сказывается на результатах разделения. При медленном токе жидкости, например порядка 8 мл/см²·ч, разделение лучше, чем при токе жидкости через ту же колонку со скоростью 20 мл/см²·ч. На разделительной способности колонки сказывается и крутизна создаваемого градиента элюции: чем круче градиент, тем острее пики на кривой элюции, однако лучшему разделению способствует более пологий градиент.

Разделение белков сыворотки крови на ДЭАЭ-целлюлозе

ДЭАЭ-целлюлоза благодаря своим функциональным группам — диэтиламиноэтильным остаткам $[-CH_2-CH_2-N=(C_2H_5)_2]$ — в водном растворе обладает свойствами слабого анионита. Используется для хроматографического фракционирования кислых и нейтральных белков.

Фракционирование белков сыворотки крови можно проводить с использованием градиентной или ступенчатой элюции. Сорбцию белков на колонке осуществляют при pH 5,65. При этом значении pH белки сыворотки крови могут сорбироваться на слабых анионитах.

Реактивы:

1. HCl — 0,5 н. раствор.
2. NaOH — 0,5 н. раствор.
3. ДЭАЭ-целлюлоза.
4. Натрий-ацетатный буфер — 0,02 М, 0,1 М и 0,5 М растворы, pH 5,65.
5. NaCl — 0,3 н. раствор, приготовленный на 0,02 М натрий-ацетатном буфере.
6. NaCl — 0,5 н. раствор, приготовленный на 0,5 М натрий-ацетатном буфере.

Подготовка сорбента. Около 10 г ДЭАЭ-целлюлозы обрабатывают и переводят в OH⁻-форму (с. 109).

После освобождения от мелких и крупных частиц⁶ ее суспендируют дважды в избытке 0,1 М натрий-ацетатного буферного раствора (pH 5,65), выдерживая каждый раз в буфере по 30 мин. Избыток жидкости удаляют декантацией. После второго суспендирования смесь вносят в колонку.

Подготовку и заполнение колонки см. на с. 102. Размер колонки 1,5×20 см. По окончании заполнения колонки ионит уплотняют либо поршнем, либо давлением воздуха до получения постоянной высоты столба геля. Затем колонку уравнивают исходным элюирующим буферным раствором 0,02 М натрий-ацетатным буфером (pH 5,65), пропуская его через колонку медленно (при данных размерах колонки со скоростью 5—6 капель в 1 мин) до тех пор, пока pH выходящего из колонки раствора не будет равен исходному. Количество раствора, не-

⁶ Если ДЭАЭ-целлюлозу используют не сразу, ее заливают водой и хранят при 4°C с добавлением следовых количеств толуола.

осаждения для уравновешивания, составляет около 8 общих объемов колонки.

Подготовка и нанесение исследуемого материала. Получение сыворотки крови см. на с. 90. Для удаления солей ее диализируют против исходного буферного раствора. Для этого сыворотку разводят в два раза исходным буферным раствором, помещают в диализный мешочек и диализируют против того же буфера в течение не менее 12 ч (можно оставлять на ночь). В отдиализированном растворе определяют содержание белка и наносят на колонку 50—100 мг белка в объеме 1—3 мл. Колонку промывают исходным буферным раствором до тех пор, пока оптическая плотность не станет равной примерно 0,05.

Элюирование белков. Скорость протекания растворов через колонку не должна превышать 15—20 мл/ч. Элюат собирают порциями по 3 мл. Элюирование белков с колонки проводят буферными растворами с линейным градиентом NaCl, меняя концентрацию последнего от 0 до 0,3 М (прибор для создания линейного градиента см. на рис. 14). В смеситель помещают 250 мл 0,02 М натрий-ацетатного буфера (рН 5,65), а в резервуар (сосуд 1) — 250 мл этого же раствора, но содержащего 0,3 М NaCl. Наиболее прочно адсорбированные белки дополнительно элюируют 0,5 М раствором NaCl в 0,5 М ацетатном буфере (рН 5,65).

Содержание белка определяют спектрофотометрически при 280 нм. На основании данных, полученных при определении содержания белка в отдельных порциях элюата, строят профиль элюции (с. 108). Рассчитывают процентное содержание белка в отдельных фракциях.

Для идентификации белков, элюируемых с колонки, содержимое пробирок, соответствующее отдельным пикам на кривой элюции, объединяют, подвергают диализу, лиофилизируют и исследуют с помощью электрофореза на бумаге или в полиакриламидном геле.

Разделение белков сыворотки крови на КМ-целлюлозе

КМ-целлюлоза — слабый катионит. Содержит в качестве ионогенных групп карбоксиметильные остатки $-\text{CH}_2-\text{COO}^-$, связанные с гидроксильными группами целлюлозы эфирными связями. Используется для разделения основных и нейтральных белков.



Фракционирование белков сыворотки крови на КМ-целлюлозе рекомендуется проводить путем создания ступенчатой элюции. Это обусловлено достаточно большими различиями в сродстве отдельных белковых фракций к иониту. Сорбция белков на колонке осуществляется при рН 4,6 («стартовый» буфер). При таком значении рН белки сыворотки крови сорбируются на слабых катионитах.

Реактивы:

1. HCl — 0,5 н. раствор.
2. NaOH — 0,5 н. раствор.
3. КМ-целлюлоза⁷.

⁷ КМ-целлюлозу в H^+ -форме можно хранить в виде водной суспензии при 4°C в присутствии антисептиков.

5. Натрий-ацетатный буфер — 0,05 М раствор, pH 5,2.
6. Натрий-ацетатный буфер — 0,08 М раствор, pH 6,0.
7. Фосфатный буфер — 0,1 М раствор, pH 7,0.
8. Фосфатный буфер — 0,1 М раствор, содержащий 0,5 М NaCl, pH 8,3.

Подготовка сорбента. Около 10 г КМ-целлюлозы обрабатывают и переводят в H^+ -форму (с. 109). Гранулярную или волокнистую целлюлозу рекомендуется отмывать после обработки кислотой или щелочью фильтрованием на воронке Бухнера или центрифугированием. Сферическую КМ-целлюлозу, которая оседает очень быстро, можно отмывать декантацией в химическом стакане. В случае необходимости КМ-целлюлозу фракционируют по размеру частиц (с. 110).

Подготовка и заполнение колонки с размером $1,5 \times 10$ см описаны на с. 102. Исходный («стартовый») буферный раствор — 0,02 М натрий-ацетатный буфер, pH 4,6.

Подготовка и нанесение исследуемого материала. Сыворотку крови (получение см. на с. 90) для удаления солей диализируют против исходного буферного раствора в течение суток. В диализированном растворе определяют содержание белка и в количестве 70—100 мг наносят его на колонку. Колонку промывают исходным буферным раствором до тех пор, пока оптическая плотность элюата не станет равна 0,02.

Фракционирование белков сыворотки крови на КМ-целлюлозе осуществляют с помощью ступенчатого элюирования, подавая на колонку последовательно следующие растворы: 0,02 М натрий-ацетатный буфер, pH 4,6 («стартовый» буфер), затем 0,05 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,2; 0,08 М натрий-ацетатный буфер, pH 6,0; 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0 и, наконец, 0,1 М фосфатный буфер, содержащий 0,5 М NaCl, pH 8,3. Каждый новый раствор подают на колонку только после того, как полностью элюируется пик, вымываемый предыдущим раствором. Скорость тока приблизительно составляет 50 мл/ч. Элюат собирают порциями по 2—3 мл. Обработку результатов см. на с. 108. Идентификацию белков осуществляют методом электрофореза на бумаге или в полиакриламидном геле (с. 112). Регенерацию КМ-целлюлозы проводят вне колонки.

Хроматография рибонуклеазы на КМ-целлюлозе

Коммерческие препараты панкреатической рибонуклеазы негомогенны. Они состоят из двух основных компонентов *A* и *B*, с близкой структурой и свойствами, но различающихся по своей специфичности. На долю компонента *B* обычно приходится от 10 до 20% от исходного препарата белка. Разделение фракций *A* и *B* осуществляют хроматографически на колонке с КМ-целлюлозой (или на амберлите IRC—50/XE-64).

Реактивы:

1. КМ-целлюлоза фирмы «Ватман».
2. Натрий-фосфатный буфер — 0,01 М раствор, pH 6,0.
3. Натрий-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, pH 7,5.
4. NaCl — 1 М раствор.
5. HCl — 0,5 н. раствор.
6. NaOH — 0,5 н. раствор.

му (с. 109). Заливают 15 объемами исходного буферного раствора (0,01 М натрий-фосфатный буфер, рН 6,0) и доводят рН полученной суспензии до 6,0. Используют колонку размером 1,5×20 см. Уравновешивание ионита осуществляют тем же буфером.

Препарат рибонуклеазы (15 мг) растворяют в 2 мл исходного буферного раствора и наносят на колонку. Элюцию белка проводят натрий-фосфатным буфером с использованием линейного градиента (с. 104): 150 мл 0,01 М буфера, рН 6,0—150 мл 0,1 М буфера, рН 7,5. Наиболее прочно сорбированные фракции элюируют 1 М NaCl. Элюат собирают порциями по 3—4 мл. Содержание белка определяют при 230 нм.

Обработку результатов см. на с. 108. Рассчитывают процентное содержание белка в отдельных фракциях рибонуклеазы.

Регенерируют КМ-целлюлозу.

МЕТОД АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Адсорбционная (жидкостная) хроматография находит широкое применение для разделения белков. При этом методе адсорбция фракционируемых соединений на сорбенте происходит под действием межмолекулярных сил.

Из большого числа поверхностно-активных веществ, пригодных в качестве сорбентов при адсорбционной хроматографии, в белковой химии широкое применение получили гели фосфата кальция. В настоящее время в хроматографии белков чаще используют особую форму фосфата кальция—гидроксилапатит ($\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$). Эта форма более устойчива в широкой области рН и обладает большей стабильностью. Гидроксилапатит готовят смешиванием растворов хлористого кальция и двузамещенного фосфата натрия. Образующийся осадок двузамещенного фосфата кальция под действием концентрированной щелочи гидролизуются в новую разновидность фосфата кальция — гидроксилапатит.

Разделение белков сыворотки крови на колонке с гидроксилапатитом

Приготовление гранулированного гидроксилапатита. Метод основан на кристаллизации гидроксилапатита в присутствии дополнительных центров кристаллизации, в данном случае частиц кремневой кислоты.

Реактивы:

1. CaCl_2 — марки х. ч. — 0,5 М раствор.
2. Na_2HPO_4 — 0,5 М раствор.
3. Силикагель — 15—20 мкм.
4. NaOH — 40%-ный раствор.
5. Натрий-фосфатный буфер — 0,01 М и 0,02 М растворы, рН 6,8.

Порошок силикагеля (0,5 г) суспендируют в 25 мл дистиллированной воды, оставляют до полного его набухания. Набухший гель дважды промывают водой, удаляя избыток жидкости декантацией. Промытый осадок переносят в стеклянный сосуд-смеситель, содержащий

100 мл воды. В этот сосуд одновременно с помощью двух перистальтических насосов приливают по 0,5 л 0,5 М раствор CaCl_2 и 0,5 М раствор Na_2HPO_4 со скоростью 0,5—0,6 мл/мин. При этом смесь тщательно и осторожно перемешивают механической мешалкой. Образовавшийся осадок после 30-минутного выстаивания промывают 4 раза водой, каждый раз удаляя избыток жидкости декантацией. Затем промытый осадок суспендируют в 1 л воды и к суспензии добавляют 25 мл 40%-ного раствора NaOH . Смесь нагревают на кипящей водяной бане до 96—98 °С и выдерживают при этой температуре в течение часа. Чтобы избежать местного перегрева и разрушения кристаллов геля, смесь во время нагревания периодически осторожно перемешивают вручную. После нагревания осадку дают отстояться, жидкость над осадком, не дожидаясь ее охлаждения, декантируют, а осадок промывают (4—5 и более раз) дистиллированной водой (по 1 л) до достижения нейтральной реакции среды в промывных водах. Время осаждения кристаллов при этом 10 мин. Промытый осадок суспендируют в литре 0,01 М натрий-фосфатного буферного раствора (рН 6,8) и нагревают на кипящей водяной бане до 96—98 °С. Жидкость над осадком декантируют, а к осадку приливают новую порцию (1 л) буфера и полученную смесь инкубируют в течение 5 мин при 96—98 °С. Снова заменяют новой порцией этого же буфера и нагревают полученную суспензию в тех же условиях еще 15 мин. Надосадочную жидкость отсасывают. Полученный гидроксилapatит осторожно суспендируют в 0,01 М растворе натрий-фосфатного буфера (рН 6,8) и через 10 мин жидкость над гелем декантируют. Операцию повторяют трижды. После этого гель суспендируют в небольшом объеме 0,01 М раствора натрий-фосфатного буфера (рН 6,8) и хранят в виде густой суспензии при низкой температуре (2—5 °С).

Колонку размером 2×20 см подготавливают так, как это описано на с. 101, и заполняют густой взвесью геля фосфата кальция до тех пор, пока высота столба геля не достигнет 15 см. Необходимо, чтобы верхний слой геля имел гладкую горизонтальную поверхность. Колонку соединяют с резервуаром, заполненным 0,01 М фосфатным буферным раствором, рН 6,8. Скорость тока жидкости устанавливают равной 5 мл/мин.

Приготовление исследуемых белковых растворов. Сыворотка крови. Кровь в количестве 4—6 мл, взятую из уха кролика, обрабатывают, как описано на с. 112. Сыворотка перед употреблением может храниться при низкой температуре (2—4 °С) не более 20 ч.

Сывороточный альбумин лизоцим и другие белки 20—30 мг растворяют в 1 мл раствора 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 6,8) и ставят на диализ против того же буферного раствора с двукратной сменой буфера не менее чем на 4 ч. Проводить диализ более 20 ч не рекомендуется, так как имеется опасность частичной денатурации белка.

Нанесение пробы на колонку. Колонку перед нанесением пробы уравнивают 8—10 объемами (300—450 мл) исходного буферного раствора (0,01 М натрий-фосфатный буфер, рН 6,8). На поверхность геля наносят 2—3 мл сыворотки крови, разведенной в 2 раза этим же буфером или 2—3 мл отдиализированного раствора одного из белков. Колонку промывают 0,01 М фосфатным буферным раствором, рН 6,8.

Элюирование белков с колонки и исследование фракций. При работе с колонками, заполненными гидроксилapatитом, рекомендуют ступенчатое повышение ионной силы.

Для разделения белков сыворотки крови используют следующую серию буферных растворов с постоянной величиной рН (6,8)⁸.

1. Натрий-фосфатный буферный раствор	0,01 М — 60 мл.
2. То же	0,06 М — 30 мл.
3. »	0,08 М — 50 мл.
4. »	0,15 М — 30 мл.
5. »	0,30 М — 30 мл.
6. Калий-фосфатный буферный раствор	0,70 М — 100 мл.

При хроматографировании сывороточного альбумина используют следующие буферные растворы с рН 6,8 в указанных количествах.

1. Натрий-фосфатный буферный раствор	0,02 М — 24 мл.
2. То же	0,07 М — 20 мл.
3. »	0,11 М — 20 мл.
4. »	0,40 М — 30 мл.

Другие белки — линейный градиент буфера 0,1—0,25 М по 75 мл.

Вытекающий из колонки элюат собирают порциями по 3 мл. Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Строят профиль элюции белковых фракций (с. 108). Зная количество белка, нанесенного на колонку, рассчитывают относительное содержание белка (в %) в отдельных фракциях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скоупс Р. Методы очистки белков. М., 1985.
2. Жидкостная колоночная хроматография/Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. М., 1978. Т. 1; Т. 2.
3. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Под ред. О. Микеша. М., 1982. Т. 1.
4. Остерман Л. М. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985.
5. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976.
6. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков/Под ред. А. Нидервайзера, Г. Патаки. М., 1974.
7. Кибардин С. А. Хроматография биополимеров на фосфат-кальциевых гелях//Усп. химии. 1965. Т. 34, № 8. С. 1472.
8. Детерман Г. Гель-хроматография. М., 1970.
9. Якубе Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1985.
10. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М., 1980.
11. Методы практической биохимии/Под ред. Б. Уильямса, К. Уилсона. М., 1978.

III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКОВ

К наиболее распространенным физико-химическим методам определения молекулярной массы белков наряду с седиментационными относятся гель-хроматография (на колонках и в тонком слое), а также электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Использование этих методов не требует сложной аппаратуры и большого количества исследуемого материала. Получаемые результаты хорошо воспроизводятся и, как правило, коррелируют с данными, полученными другими методами.

1. МЕТОД ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ НА КОЛОНКАХ

Принцип метода основан на том, что для большого числа глобулярных белков имеется линейная зависимость между логарифмом мо-

⁸ При использовании указанных количеств буферных растворов фонового значения оптической плотности не достигается.

лекулярной массы и объемом элюирования с колонки, заполненной гелем с определенной величиной пор. Поэтому для определения молекулярной массы глобулярного белка достаточно определить объем его элюции с предварительно откалиброванной колонки. Калибровку колонки проводят, пропуская через нее белки с известной молекулярной массой и определяя объемы элюции для каждого из них. Объем элюции (V_e) — это объем элюата, собранного с момента внесения вещества на колонку до момента его элюции с колонки, включая фракцию с максимальным его содержанием. величиной, более стабильной, чем объем элюции (V_e), не зависящей от уровня геля в колонке, является величина K_{av} .

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

где V_e — объем элюции для данного вещества, V_0 — свободный объем колонки, V_t — общий объем колонки.

Реактивы и оборудование см. на с. 106, рис. 12, 13.

Подготовку колонки и проведение процесса хроматографии см. на с. 102. Все операции можно осуществлять при комнатной температуре. После определения свободного объема V_0 через колонку последовательно пропускают растворы соответствующих белков-«маркеров» (по 3–4 мг в объеме 0,5–1 мл)⁹. Белки удобно наносить последовательно в порядке уменьшения их молекулярной массы с интервалом, зависящим от размера колонки. Для колонки 1,5×50 см он равен 20 мл (объем собираемого элюата между нанесением отдельных образцов составляет 20 мл). Во время нанесения белков колонку перекрывают. Элюат, вытекающий из колонки со скоростью 15–20 мл/ч, собирают небольшими порциями (1–3 мл). Строят профиль элюции отдельных белковых фракций (с. 108). Затем строят график зависимости отношения объема выхода белка к свободному объему колонки V_e/V_0 или величины K_{av} от логарифма молекулярной массы белков.

После построения калибровочного графика на колонку наносят исследуемый белок и, определив объем элюции, находят по графику его молекулярную массу.

2. ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ СЕФАДЕКСА

По мере продвижения раствора по пластинке с нанесенным на нее тонким слоем геля сефадекса смесь белков распределяется в нем таким образом, что расстояние, пройденное каждым белком от линии старта, пропорционально логарифму его молекулярной массы. Построив калибровочный график зависимости расстояния, пройденного белками-маркерами, от логарифма их молекулярной массы и определив длину пути, пройденного исследуемым белком, можно определить его молекулярную массу.

Реактивы:

1. Сефадекс G-200 или G-150 (superfine).
2. Фосфатный буфер — 0,1 М раствор, pH 7,4.
3. Бромфеноловый синий — 0,1%-ный раствор, приготовленный на смеси этанол — концентрированная уксусная кислота (9:1).

⁹ Цитохром с достаточно наносить в количестве 2 мг, гистон H_1 — в количестве 5 мг.

4. CH_3COOH — 5%-ный раствор.
5. CH_3COONa — 2%-ный раствор на 10%-ном растворе CH_3COOH .
6. Набор белков-маркеров с известной молекулярной массой. Кроме белков, указанных на с. 107, можно использовать химотрипсиноген А (25 700 Да), креатинкиназу из мышц кролика (80 000 Да), глицеральдегидфосфатдегидрогеназу (144 000 Да), пируваткиназу (237 000 Да) и др.
7. Хроматографическая бумага — ватман 3 ММ.

4 г сухого сефадекса суспендируют в избытке фосфатного буфера и оставляют набухать в течение 3 сут при комнатной температуре или в течение нескольких часов при 60°С. Перед нанесением на стеклянную пластинку (20×40 см), которая должна быть вымыта с особой тщательностью, избыток буфера над гелем декантируют, а гель перемешивают и наносят фарфоровой ложкой на пластинку, расположенную на столике со строго горизонтальной поверхностью (горизонтальность проверяют с помощью уровня). Слой геля распределяют по пластинке стеклянной палочкой размером 1×22 см с надетой на концы резиновой трубкой, прокатывая палочку вдоль пластинки несколько

раз для получения равномерного слоя геля толщиной 1 мм (без комочков и пузырьков воздуха). Пластинку подсушивают на воздухе в течение 15 мин, а затем помещают в средний отсек камеры (рис. 15). Крайние резервуары заливают 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4), слой геля соединяют с буферным

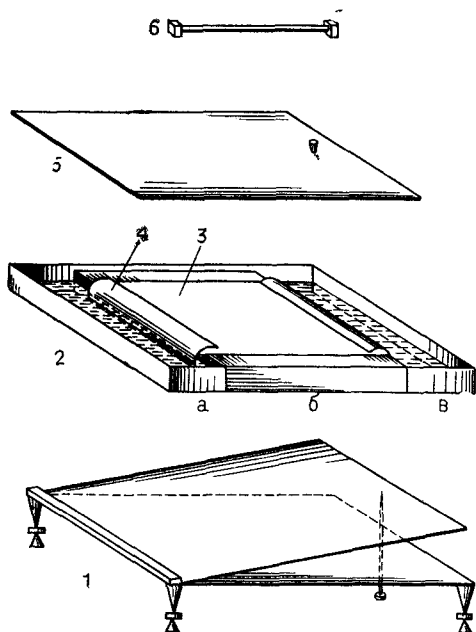


Рис. 15. Оборудование для хроматографического разделения белков в тонком слое сефадекса.

1 — столик с переменным углом наклона; 2 — хроматографическая камера (а, в — отсеки, заполненные буферным раствором; б — отсек, в который помещают стеклянную пластинку); 3 — стеклянная пластинка, покрытая гелем сефадекса; 4 — соединительные мостики из фильтровальной бумаги; 5 — скользящая крышка; 6 — стеклянная или металлическая палочка

раствором полосками хроматографической бумаги, камеру закрывают скользящей крышкой и помещают на подставку с переменным углом. Угол наклона камеры устанавливают равным 7—10°. Камеру оставляют для насыщения на ночь при комнатной температуре.

Убедившись в равномерности слоя сефадекса, наносят микропипеткой по 0,01—0,02 мл растворов (5 мг/мл) исследуемого белка и белков-свидетелей. Для этого пластинку устанавливают горизонтально и наносят белки в отдельные точки на расстоянии 3 см от верхнего края пластинки и друг от друга. Закрывают камеру крышкой и уста-

навливают ее под углом $1-10^\circ$. Ель-хроматографию проводят в течение 4–5 ч при комнатной температуре. Затем камеру устанавливают горизонтально, полоски хроматографической бумаги удаляют, пластинку помещают на горизонтальную подставку и снимают реплику на хроматографическую бумагу ватман 3 ММ. Для этого бумагу свертывают в трубочку и, постепенно разворачивая, накладывают на тонкий слой так, чтобы бумага прилипла к нему. Не следует сильно надавливать на бумагу, чтобы не повредить слой сефадекса. Бумагу оставляют на пластинке 1 мин, затем высушивают при 90°C в течение 20 мин и помещают в кювету для окрашивания.

Для идентификации белковых зон реплику помещают на 3–5 мин в раствор бромфенолового синего; краситель отмывают дважды 5%-ным раствором CH_3COOH и закрепляют 2%-ным уксуснокислым натрием, приготовленным на 10%-ном растворе CH_3COOH . После тщательного промывания в холодной проточной воде хроматографическую бумагу высушивают и измеряют расстояние, пройденное каждым белком от точки нанесения до центра белкового пятна. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс величину отношения $l_a:l_{\text{ст}}$ (l_a — длина пути, пройденного данным белком; $l_{\text{ст}}$ — расстояние, пройденное стандартным белком, например цитохромом c или химотрипсиногеном A), по оси ординат — логарифм молекулярной массы данного белка. Определив расстояние белковой зоны исследуемого белка от старта, по калибровочному графику находят его молекулярную массу.

3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

Белки, обработанные концентрированным раствором додецилсульфата натрия в присутствии β -меркаптоэтанола, распадаются на отдельные полипептидные цепи и приобретают отрицательный заряд, значительно превышающий собственный заряд белковой молекулы. При последующем разделении с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле белковые зоны распределяются на электрофореграммах таким образом, что подвижность белковой зоны обратно пропорциональна логарифму молекулярной массы. Метод дает возможность определять молекулярные массы субъединиц олигомерных белков. Электрофоретическое разделение можно проводить различными методами. Ниже описаны два из них: метод Вебера и Осборн, а также метод, предложенный Лэммли.

В методе Вебера и Осборн буферные растворы для приготовления геля и электродный не отличаются между собой. Обычно используют 0,1 или 0,05 М натрий-фосфатный буфер. В методе Лэммли гелевый и электродный буферные растворы отличаются друг от друга по составу и величине pH. Кроме того, используют два типа гелей — концентрирующий и разделяющий. Эти модификации приводят к тому, что на границе между концентрирующим и разделяющим гелем весь белковый образец собирается в виде узкого диска. Это способствует более четкому разделению белков.

МЕТОД ВЕБЕРА И ОСБОРН

Реактивы:

1. Акриламид — 30%-ный раствор, содержащий 0,6% метиленбисакриламида.

Внимание. Габбиту с акриламидом проводят под тягой, в перчатках!

2. Буфер для приготовления геля — 0,2 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2.
3. Буфер для приготовления образцов — 0,02 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2.
4. Электродный буфер — 0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2.
5. Персульфат аммония — 15 мг/мл (готовят непосредственно перед употреблением).
6. ТЕМЕД.
7. Сахароза — 40%-ный раствор.
8. Изопропиловый спирт — 70%-ный.
9. Краситель кумасси R-250 — 0,04%-ный раствор, приготовленный на 20%-ном изопропанол и 10%-ной CH_3COOH .
10. Уксусная кислота — 10%-ный раствор.
11. Додecilсульфат натрия (ДСН) — 10%-ный раствор.
12. β -меркаптоэтанол.
13. Набор белков-маркеров с известной молекулярной массой

В качестве белков-маркеров можно использовать следующие белки: фосфорилаза (91 000 Да), бычий сывороточный альбумин (68 000 Да), яичный альбумин (42 000 Да), химотрипсинаген А (27 000 Да), ингибитор трипсина из сои (24 000 Да), РНК-аза (14 000 Да), цитохром с (12 000 Да) и др.

Подготовка образцов. В растворы опытных и стандартных белков, содержащие 2–5 мг/мл, добавляют 10%-ный ДСН до конечной концентрации 1% и β -меркаптоэтанол (для предотвращения неспецифической агрегации полипептидных цепей) до конечной концентрации 1–5%. Образцы выдерживают 5 мин при температуре 90°С. Если опытные или стандартные образцы находятся в растворах, содержащих ионы K^+ или NH_4^+ , перед обработкой ДСН их нужно обессолить диализом или гель-хроматографией, так как додecilсульфат калия и аммония плохо растворимы в воде.

Приготовление геля. Сливают в эрленмейеровскую колбочку 10 мл раствора акриламида, 15 мл фосфатного буфера, содержащего 30 мг ДСН, 3,5 мл H_2O , 1,5 мл персульфата аммония и 0,04 мл ТЕМЕД. Далее поступают, как указано на с. 95.

Проведение электрофореза. Разделение можно проводить как в трубочках (с. 95), так и на пластинах для вертикального электрофореза (с. 97). После обработки ДСН к образцам добавляют сахарозу (до концентрации 10%) и в качестве лидирующего красителя — бромфеноловый синий (до концентрации 0,001%). Образцы исследуемых белков и белков-маркеров наносят на поверхность геля в объеме от 20 до 100 мкл (каждого или смеси нескольких образцов) и осторожно настилают электродный буфер. Нагрузка на гель определяется методом окраски гелей, а также способностью того или иного белка связывать используемый краситель. Как правило, при электрофорезе в трубочках удается обнаружить от 20 до 100 мкг белка, при электрофорезе в пластинке — от 4 до 15 мкг. В электродный буфер катодного отделения добавляют ДСН до концентрации 0,1%. Электрофоретическое разделение проводят при комнатной температуре и силе тока 8 мА на трубочку. При этом сначала устанавливают силу тока — 2 мА на трубочку (напряжение около 50 В), напряжение поднимают до 100–200 В лишь после того, как образцы войдут в гель. При про-

ведении электрофореза в пластине напряженность электрического поля сначала устанавливают равной 6—7 В/см, после проникновения образцов в разделяющий гель напряженность можно увеличивать до 15—20 В/см. Разделение проводят до тех пор, пока краситель не пройдет 4/5 всей длины геля. Обычно это занимает 4—6 ч. После этого электрофорез прекращают, вынимают гель и помещают его для фиксации в 70%-ный изопропанол на 0,5—1 ч. Затем гели прокрашивают раствором кумасси R-250 в течение 2—3 ч. Избыток краски удаляют промыванием 10%-ным раствором CH_3COOH .

Обработка электрофореграмм. Определяют расстояние, пройденное каждым белком от стартовой линии. Определение можно проводить визуально или с помощью денситометра при 550—600 нм. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс длину пути l_a , пройденного данным белком, а по оси ординат — логарифм его молекулярной массы. Определив длину пути, пройденного белком с известной молекулярной массой l_x , пользуясь калибровочным графиком, определяют молекулярную массу исследуемого белка. При проведении электрофореза в трубочках часто трудно получить хорошо воспроизводимые результаты на разных трубках. В этом случае определяют не абсолютную, а относительную подвижность белков. Для этого определяют отношение длины пробега белковой зоны либо к общей длине геля, либо к длине пробега лидирующего красителя. После этого строят зависимость относительной подвижности белков от логарифма их молекулярной массы.

МЕТОД ЛЭММЛИ

Реактивы:

1. Акриламид — 30%-ный раствор, приготовленный на 0,4%-ном растворе метиленбисакриламида. 29,6 г акриламида и 0,4 г метиленбисакриламида растворяют в воде и объем раствора доводят до 100 мл. Раствор хранят в темной склянке в холодильнике.

Внимание! Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках!

2. Буфер для приготовления разделяющего геля — 1,5 М трис-HCl буфер, содержащий 0,4%-ный ДСН, рН 8,8.
3. Буфер для приготовления концентрирующего геля — 0,5 М трис-HCl буфер, содержащий 0,4%-ный ДСН, рН 6,8.
4. Электродный буфер: 0,025 трис-0,192 М глицин, рН 8,6. Необходимую навеску глицина растворяют в воде и добавляют сухой трис до рН 8,6, после чего объем раствора доводят водой до нужной величины. Электродный буфер катодного отделения камеры содержит помимо указанных компонентов ДСН в концентрации 0,1%.
5. Буфер для приготовления образцов: 0,0625 М трис-HCl буфер, рН 6,8, 2%-ный ДСН, 10%-ный раствор сахарозы (или глицерин), 0,001%-ный бромфеноловый синий. Перед употреблением в указанный раствор добавляют β -меркаптоэтанол до конечной концентрации 5%.
6. Персульфат аммония.
7. ТЕМЕД.
8. Изопропиловый спирт — 70%-ный раствор.
9. Уксусная кислота — 10%-ный раствор.

10. Кумасси R-250 — 0,04%-ный раствор, приготовленный на смеси: изопропанол—этанол—уксусная кислота—вода в соотношении 2:1:1:6.
11. Набор белков-маркеров с известной молекулярной массой (с. 120).

Приготовление геля. Для полимеризации 30 мл разделяющего геля (12,5%) смешивают 12,5 мл раствора акриламида, 7,5 мл буфера разделяющего геля и 10 мл воды. После деаэрирования (5–10 мин на водоструйном насосе) к смеси добавляют 16 мг персульфата аммония и 18 мкл ТЕМЕД. Полученный раствор заливают либо в гелевую ячейку для вертикального электрофореза в пластине (с. 97), либо в трубки (с. 95). На поверхность раствора наслаивают воду. После полимеризации удаляют воду шприцом или фитилем из фильтровальной бумаги. Готовят смесь для концентрирующего геля. Смешивают 4 мл раствора № 1 с 5 мл буфера концентрирующего геля и добавляют 11 мл воды (суммарный объем 20 мл). Полученную смесь деаэрируют, добавляют 15 мг персульфата аммония и 16 мкл ТЕМЕД и наносят на вершину уже запolyмеризовавшегося разделяющего геля. Обычно длина концентрирующего геля в 5–6 раз меньше длины разделяющего геля. На поверхность полимеризуемых гелей наслаивают воду.

Подготовка образцов. Исследуемые и стандартные белки-маркеры растворяют в буферном растворе для приготовления образцов в концентрации 1–2 мг/мл и нагревают 5–10 мин на кипящей водяной бане. Исследуемые образцы белков не должны содержать ионов K^+ и NH_4^+ (с. 120).

Электрофорез и обработку электрофореграмм проводят, как описано на с. 120.

ЛИТЕРАТУРА

1. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985.
2. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Под ред. О. Микеша. М., 1982. Т. 1.
3. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1985.
4. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., 1981.
5. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971.
6. Доис Э. Количественные проблемы биохимии. М., 1983.
7. Шелудько Н. С. Белковый состав миофибрилл кролика, определенный методом диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия//Цитология. 1974. Т. 15. С. 597.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T—4//Nature. 1970. Vol. 227. P. 681.

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Химические, физико-химические свойства белков и их структура определяются аминокислотным составом. Поэтому исследование аминокислотного состава является важным аналитическим методом характеристики этих соединений. Исследование аминокислотного состава белков и пептидов включает расщепление этих соединений до свободных аминокислот, разделение последних, их идентификацию и количественное определение. Изучению аминокислотного состава предшествует, как правило, определение однородности изучаемых препаратов. О чистоте препаратов белка судят на основании данных ультрацентрифугирования, электрофореза, в частности диск-электрофореза

(иногда в присутствии додецилсульфата натрия), хроматографии на колонках, а также по числу N- и C-концевых аминокислот и др.

При изучении химической структуры биологически активных белков, например ферментов, важное значение имеет определение различных функциональных групп белковой молекулы: SH-групп, OH-групп серина и треонина, ϵ -NH₂-группы лизина, имидазольного цикла гистидина и др.

1. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Определение качественного и количественного аминокислотного состава белков и пептидов проводят после их гидролиза кислотой или щелочью. Оба вида гидролиза разрушают некоторые аминокислоты. При щелочном гидролизе частично разрушаются цистеин, серин, треонин и происходит частичная рацемизация некоторых аминокислот. При гидролизе соляной кислотой (5,7 н., 105–110°С), которая обычно используется при кислотном гидролизе пептидных связей, практически полностью разрушается триптофан. В связи с этим содержание триптофана в пробах обычно определяют после щелочного гидролиза или спектрофотометрическим методом¹⁰. Кроме того, наблюдаются значительные потери оксиаминокислот (серина, треонина, тирозина), серусодержащих аминокислот (цистеина, метионина) и частично пролина. При этом степень разрушения аминокислот зависит от чистоты и концентрации HCl, используемой для гидролиза, а также длительности и температуры гидролиза. Следует отметить, что примеси альдегидов при кислотном гидролизе приводят к значительной потере тирозина, а также цистеина, гистидина, глутаминовой кислоты и лизина, а примеси углеводов в больших концентрациях — к разрушению аргинина.

Снижению потерь большинства аминокислот при кислотном гидролизе способствует проведение его в стеклянных ампулах под вакуумом с большим избытком (200–5000-кратным) тщательно очищенной и перегнанной над SnCl₂ соляной кислоты. Распад тирозина предупреждают добавлением в ампулу фенола. Чтобы избежать превращения серусодержащих аминокислот в продукты различной степени окисления при гидролизе и последующих процессах хроматографии и электрофореза, образцы белка, содержащие цистеин и цистин, до гидролиза обрабатывают надмуравьиной кислотой. При этом образуется стойкое производное — цистеиновая кислота. Гидролиз проводят в течение 24, 48, 72 и 120 ч. Если содержание какой-либо аминокислоты с увеличением времени гидролиза постепенно уменьшается, его находят на графике зависимости содержания этой аминокислоты от длительности гидролиза путем экстраполяции к нулевому времени гидролиза. Если же содержание аминокислоты в ходе гидролиза постепенно увеличивается, истинную величину также определяют графически, ограничивая время гидролиза 96 или 120 ч¹¹.

¹⁰ Определять триптофан можно и после кислотного гидролиза белка в смеси соляной и 2–4%-ной тиогликолевой кислот.

¹¹ Для кислотного гидролиза белков и пептидов помимо 5,7 н. HCl используют также сульфокислоты. Более легкому гидролизу пептидных связей, образованных гидрофобными аминокислотами, способствует проведение гидролиза в смеси концентрированной HCl и сильной органической кислоты, например трифторуксусной (2.1). Время гидролиза в этом случае ограничивается 25, 50 и 75 мин. Температура гидролиза 166°С.

Во избежание разрушения аминокислот после окончания гидролиза за счет наличия в гидролизатах свободной минеральной кислоты, а также гуминовых веществ следует как можно быстрее удалить последние из гидролизата. Гуминовые вещества удаляют фильтрованием, а HCl — упариванием в вакууме (обычно на роторном испарителе).

Окисление белка надмуравьиной кислотой

Реактивы:

1. HCOOH — 85%-ный раствор.
2. H₂O₂ — 30%-ный раствор.

Надмуравьиную кислоту готовят из 85%-ной HCOOH и 30%-ной H₂O₂, смешивая их в соотношении 9:1 в сосуде с притертой пробкой. Смесь выдерживают в течение 5 мин при комнатной температуре и затем 10—15 мин на холоде (0°С) (можно выдерживать 30 мин лишь при комнатной температуре). При получении надмуравьиной кислоты сосуд плотно закрывают пробкой со шлифом, смазанным смазкой. Остаток кислоты выливают после разбавления водой под тягой и смывают большим количеством воды.

Внимание! Надмуравьиная кислота является сильным окислителем. Поэтому всю работу с ней проводят под тягой.

К образцу белка добавляют 1—2 мл надмуравьиной кислоты и оставляют в закрытом сосуде в течение часа на холоде. После этого содержимое сосуда разводят водой в 50 раз и высушивают образец лиофилизацией или на роторном испарителе. Во избежание попадания сильного окислителя в приборы образцы белка можно высушивать в специально отведенном для этих целей вакуумном эксикаторе над NaOH. В этом случае раствор белка в надмуравьиной кислоте разбавляют равным объемом воды и выпаривают. Процедуру с добавлением воды и выпариванием над NaOH повторяют 3 раза.

КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ

Реактивы:

1. HCl — 5,7 н. раствор (трижды перегнанная). Концентрированную HCl квалификации «химически чистая» (х. ч.) разводят водой в 2 раза и 2 ч кипятят с обратным холодильником над SnCl₂ (3—4 г на литр раствора). Затем раствор перегоняют в аппарате со стеклянными шлифами и собирают фракцию при 106—107°С. Перегонку проводят трижды.
2. SnCl₂.
3. Фенол (см. с. 168).

К 1—2 мг белка (пептида) в небольшой пробирке добавляют 1 мл 5,7 н. раствора трижды перегнанной HCl и смесь осторожно, с помощью пастеровской пипетки переносят в тщательно вымытую и высушенную ампулу из толстостенного стекла (1×7 см). Пробирку трижды споласкивают 5,7 н. HCl (по 0,5 мл); той же пипеткой раствор переносят в ампулу с пробой и добавляют туда кристаллик (либо 1—2 капли 5%-ного водного раствора) фенола. Содержимое ампулы замораживают жидким азотом или смесью ацетон — твердая CO₂, обвязывают марлей, ампулу присоединяют к водоструйному или масляному насосу и отсасывают воздух. Затем содержимое ампулы осто-

рожно размораживают и операцию с откачкой воздуха проводят еще раз (если в лаборатории нет твердой CO_2 или жидкого азота, отсасывание воздуха из ампулы проводят в течение 10–15 мин после закипания кислоты). После этого ампулу запаивают под вакуумом, ставят в стакан и помещают в термостат при 110°C . Гидролиз проводят в течение 24–48 ч, затем ампулу охлаждают, вскрывают (все операции с ампулой, в том числе и вскрытие, проводят в защитных очках), содержимое переносят в небольшую коническую или круглодонную колбу и соляную кислоту упаривают досуха на роторном испарителе при $40\text{--}65^\circ\text{C}$. Для удаления HCl добавляют в колбу 1,5 мл воды и снова упаривают. Последнюю операцию повторяют дважды (упаривание в роторном испарителе можно заменить упариванием в вакуум-эксикаторе над гранулированным NaOH (KOH) и P_2O_5). Колбу хранят в вакуум-эксикаторе с NaOH .

ЩЕЛОЧНОЙ ГИДРОЛИЗ

Реактивы:

1. NaOH — 2 н. раствор.
2. Натрий-цитратный буфер, pH 3,3 (0,4 М по Na^+):

лимонная кислота	— 84 г,
NaOH	— 16 г.
HCl (37%)	— 5,9 мл,
H_2O	— до 1 л.
3. HCl — 5,7 н. раствор.

К 10 мг белка (пептида) в небольшой пробирке добавляют 1 мл 2 н. раствора NaOH и раствор с помощью пастеровской пипетки переносят в ампулу для гидролиза (с. 124). Пробирку дважды споласкивают 2 н. NaOH по 0,5 мл; той же пипеткой раствор переносят в ампулу с пробой. Ампулу вакуумируют и запаивают. Техника удаления воздуха из ампулы и ее запаивания та же, что и при кислотном гидролизе белка. Гидролиз проводят при 110°C в течение 5 ч. По окончании гидролиза ампулу охлаждают, вскрывают и добавляют 1,6 мл натрий-цитратного буферного раствора pH 3,3 и 1 мл 5,7 н. раствора HCl . Полученный гидролизат используют для идентификации и количественного определения аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976. С. 165.
2. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985. С. 525.
3. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков /Под ред. Нидервайзера, Г. Патаки. М., 1974.
4. Баратова Л. А., Белянова Л. П. Определение аминокислотного состава белков/Методы биохимического эксперимента. М., 1974. С. 3.
5. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. Основы биохимии. М., 1981. Т. 1. С. 166.
6. Бэйли Дж. Методы химии белков. М., 1965. С. 117.

2. РАЗДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Наиболее совершенным методом для количественного анализа аминокислотного состава белков и пептидов в настоящее время является их определение с помощью автоматических приборов — анализаторов аминокислот. Разделение аминокислот в них происходит по

типу ионообменной хроматографии на колонках, заполненных сульфополистирольными катионитами (с. 132). Этот метод был описан в 1958 г. Спекманом, Муром и Стайном. При отсутствии таких приборов или в случае анализа несложной смеси аминокислот, состоящей из малого числа компонентов, используют технику электрофореза на бумаге или в тонком слое и различные виды хроматографии: газовую (с помощью газовых хроматографов), распределительную (бумажную) и ионообменную в тонком слое.

МЕТОД ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Хроматография на бумаге — один из видов распределительной хроматографии (с. 45).

При разделении аминокислот и пептидов обычно пользуются трехкомпонентными системами: к насыщенному водой органическому растворителю добавляют кислоты, основания, некоторые спирты, кетоны и др. Это приводит, во-первых, к повышению растворимости воды в подвижной фазе (увеличению гидрофильности системы), во-вторых, к изменению диссоциации кислых и основных групп разделяемых соединений. Вследствие этого кислоты замедляют движение оснований, а основания — кислот.

На практике для разделения аминокислот и пептидов основного характера используют системы, содержащие фенол и крезол, для нейтральных — смеси с бутиловым спиртом и уксусной кислотой или с амиловым спиртом, а для кислых аминокислот и пептидов — системы, содержащие соединения основного характера (обычно пиридин). Если соединение плохо растворимо в подвижной фазе и остается на стартовой линии, следует увеличить гидрофильность системы, например, добавлением муравьиной кислоты, метанола или формамида. Если же вещество хорошо растворимо в подвижной фазе и движется вместе с фронтом растворителя, следует использовать органический растворитель с более выраженными гидрофобными свойствами, например изоамиловый, бензиловый спирты и др.

Для лучшего разделения соединений с близкими значениями R_f , а также для увеличения R_f часто проводят хроматографирование в нескольких (обычно двух) системах растворителей, пропуская второй растворитель в том же направлении, что и первый. Это приводит к уплощению пятен разделяемых соединений в направлении, перпендикулярном пропускаемому растворителю, и способствует их лучшему разделению. Более полное разделение аминокислот и пептидов достигается при двухмерной хроматографии (второй растворитель пропускают в направлении, перпендикулярном первому) или при сочетании хроматографии (одно направление) и электрофореза (второе взаимно перпендикулярное направление). Последний метод носит название метода «пептидных карт» или «отпечатка пальцев».

При повторном разделении в системах растворителей положение пятна на хроматограмме устанавливают путем определения значений коэффициента относительной скорости движения R_{st} , где

$$R_{st} = \frac{\text{расстояние анализируемого соединения от старта}}{\text{расстояние стандарта от старта}}.$$

В качестве стандарта можно использовать одно из веществ разделяемой смеси. Получаемые значения R_{st} являются более воспроизводимыми, чем величина R_f .

Реактивы:

1. Хроматографическая бумага: ватман 1—4, FN 2—5 или ленинградская.
2. *n*-Бутиловый спирт.
3. C_3H_7COOH — концентрированная.
4. Изопропиловый спирт.
5. Растворы аминокислот-«свидетелей». 50 мМ растворы отдельных аминокислот в смеси муравьиная кислота — уксусная кислота — вода в объемных отношениях 7:5:13.
6. Раствор для окрашивания. 0,2%-ный раствор нингидрина на смеси: 95 мл ацетона, 4 мл воды, 1 мл ледяной уксусной кислоты; готовят непосредственно перед употреблением.
7. Раствор для закрепления окраски. 10 мл водного насыщенного раствора $CuNO_3$ смешивают с 0,2 мл азотной кислоты и 100 мл ацетона. Полученную смесь фильтруют.
8. Раствор для элюции аминокислот из бумаги. 500 мл этанола смешивают с 0,2 мл насыщенного водного раствора $CuSO_4$.

Подготовка бумаги¹². Вырезают полосу бумаги, размеры которой определяются количеством исследуемых проб и величиной хроматографической камеры. В 5—10 см от конца полосы (зависит от высоты лодочки) проводят простым карандашом стартовую линию и отмечают точки нанесения раствора в 3 см от краев хроматограммы и в 2,5 см одна от другой. Для лучшего разделения образцов с большим набором аминокислот край бумаги, на который наносят гидролизат, вырезают, как это показано на рис. 16.

Получение хроматограммы. Гидролизат после упаривания на ротаторном испарителе растворяют в 0,5 мл смеси муравьиная кислота — уксусная кислота — вода. Гидролизат можно растворять также в смеси изопропанол — вода (1:9). В этом случае, если необходимо для лучшего растворения, добавляют каплю концентрированной уксусной кислоты или концентрированного аммиака, что определяется экспериментальным путем в отдельной пробе.

Простым карандашом делают надписи на хроматограмме. В центральные точки

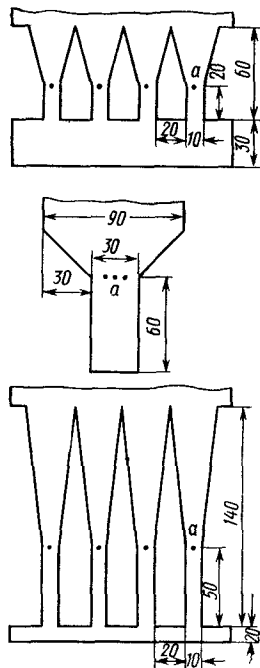


Рис. 16. Форма бумажной полосы, обеспечивающая лучшее разделение аминокислот (размеры даны в миллиметрах; *a* — точки нанесения образца)

стартовой линии хроматограммы наносят различные количества анализируемого гидролизата. Вносят в одну точку такое количество гидролизата, в котором содержание каждой из аминокислот составляет в среднем 0,1—0,2 мкмоль. Для подсчета этой величи-

¹² Все операции при работе с бумажными хроматограммами и электрофореграммами, включая подготовку бумаги, следует проводить в чистых резиновых перчатках, чтобы избежать попадания аминокислот с кожи пальцев на бумагу.

ны рекомендуется исходить из микромолярной концентрации белка (пептида), взятого для гидролиза, и суммарного содержания аминокислотных остатков в полипептидной цепи (с. 134). Для нанесения гидролизата на бумагу можно пользоваться микрошприцем, полуавтоматической пипеткой, микропипеткой на 0,1 мл с оттянутым в капилляр и изогнутым концом или калиброванным капилляром. Диаметр наносимых пятен не должен превышать 0,3–0,5 см (объем каждой капли около 0,003–0,005 мл). При нанесении раствора в одну и ту же точку бумаги соответствующее место каждый раз подсушивают током теплого воздуха. Если расстояние между точками нанесения превышает 2,5 см, раствор можно наносить в виде полосы.

Для идентификации аминокислот в исследуемом гидролизате наряду с опытными пробами (или предварительно, до анализа опытных проб) на хроматограмму наносят растворы аминокислот-«свидетелей». После установления местоположения пятен отдельных аминокислот-«свидетелей» последние в дальнейшем на хроматограмму можно наносить в составе смесей. Смеси должны иметь известный состав и хорошо разделяться при данных условиях хроматографирования. Этим требованиям удовлетворяют смеси аминокислот следующего состава:

а) цистеиновая кислота, гистидин, аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кислота, аланин, триптофан, метионин, фенилаланин, лейцин;

б) цистеиновая кислота, лизин, аргинин, серин, треонин, аланин, пролин, тирозин, валин, изолейцин.

Смеси «свидетелей» помещают в крайние точки стартовой линии хроматограмм по 0,05–0,1 мкмоль каждой аминокислоты в пятно.

Хроматограмму укрепляют в лодочке для нисходящей хроматографии и помещают в хроматографическую камеру (рис. 17), предварительно насыщенную парами воды и органического растворителя.

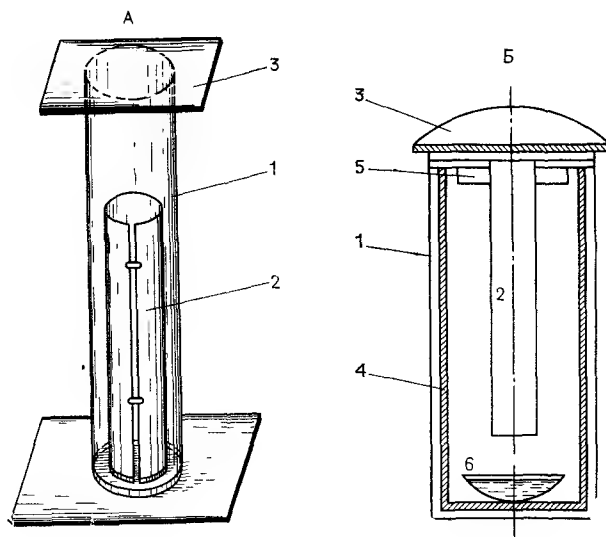


Рис 17. Камеры для получения восходящей (А) и нисходящей (Б) хроматограмм. 1 — камера; 2 — бумага; 3 — крышка камеры; 4 — подставка для ванночки (лодочки); 5 — лодочка; 6 — чашка с водой или растворителем

Для лучшего насыщения камеры ее стенки оклеивают листами фильтровальной бумаги, смоченной водой (иногда и органическим раство-

рителем). Такое насыщение предотвращает испарение растворителя при движении его по бумаге.

В качестве растворителей для хроматографии аминокислот обычно используют последовательно 2 системы:

1) *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (4:1:5); компоненты смеси тщательно встряхивают 5—10 мин в делительной воронке и после расслаивания используют верхний слой;

2) *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (8:3:1).

Для лучшего разделения сложной смеси аминокислот, имеющих близкие величины R_f , пропускание каждого растворителя по хроматограмме повторяют несколько раз (обычно дважды). В этом случае фронт каждого последующего растворителя должен продвигаться по бумаге несколько дальше предыдущего. Перед использованием каждого следующего растворителя хроматограммы вынимают из камеры и высушивают на воздухе.

Для оптимального разделения некоторых аминокислот, плохо отделяющихся друг от друга в перечисленных системах, используют и другие растворители, которые приведены в соответствующих руководствах (см., например: Хроматография на бумаге//Под ред. И. Хайса и К. Мацека. М., 1962). Так, для отделения валина от фенилаланина (проблема, возникающая при анализе антибиотика грамицидина С, состоящего всего из пяти разных аминокислот) можно рекомендовать последовательное пропускание двух растворителей: систему 2-бутанол — 3%-ный аммиак (3:1), а затем систему *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (8:3:1).

Идентификация аминокислот

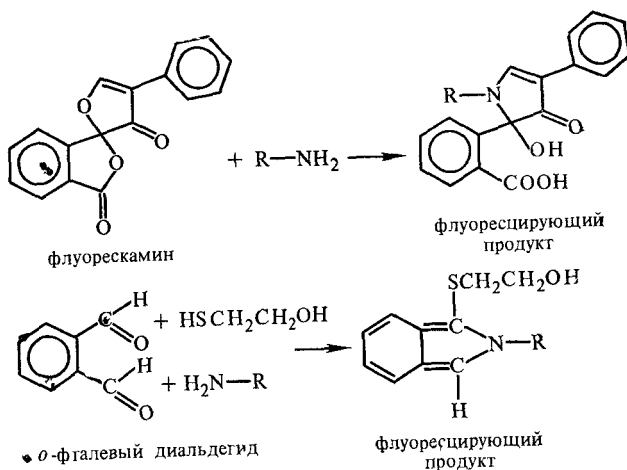
Аминокислоты открывают с помощью соединений, образующих с ними окрашенные или флуоресцирующие продукты. Наиболее широкое распространение для идентификации аминокислот получил нингидрин. Продукт реакции с нингидрином имеет сине-фиолетовую окраску с максимумом поглощения при 570 нм (для пролина 440 нм).

Проявление нингидрином. Раствор нингидрина наливают в ванночку и равномерно пропитывают им хроматограмму. Хроматограмму высушивают под тягой и выдерживают в темноте при комнатной температуре около 12 ч. В этих условиях с нингидрином реагируют все α -аминокислоты (другие аминокислоты дают реакцию при более высокой температуре — около 100°C). Проявление хроматограмм при качественной хроматографии можно ускорить, помещая последние на 5—10 мин в термостат при 60°C. Окраска, получаемая при проявлении аминокислот нингидрином, неустойчива. Ее можно закрепить, опрыскивая проявленную хроматограмму из пульверизатора раствором ацетона, содержащим азотнокислую медь. Стойкую окраску можно получить при внесении в нингидриновый реактив кадмия (с. 135) или стронция. Окраска сохраняется в течение нескольких недель при проявлении аминокислот смесью 1%-ного раствора нингидрина в ацетоне и 1%-ного раствора хлористого стронция в 20%-ном растворе CH_3COOH (1:6).

Сопоставляя положение аминокислот гидролизата с положением аминокислот-«свидетелей», определяют аминокислотный состав гидролизата.

Проявление флуорескамино м. Помимо нингидрина для проявления аминокислот в настоящее время используют реагенты, дающие с аминокислотами, пептидами и белками флуоресцирующие

1. 10-флуорескамин (Гшан) и *o*-фталевый диальдегид. Последний реагирует с первичными аминами в присутствии восстановителей (β -меркаптоэтанола).



Образование продуктов, обладающих флуоресценцией (сами реагенты не флуоресцируют), позволило значительно увеличить чувствительность метода. С флуорескамином открывается 10⁻⁹–10⁻¹¹ молей аминокислот. В отличие от нингидрина реакции не мешает присутствие аммиака. Реакция протекает при комнатной температуре при pH 7,0–9,0. Поскольку флуорескамин в водной среде разрушается (в течение нескольких секунд), для приготовления раствора используют безводные жидкости (ацетон, ацетонитрил, диметилсульфоксид и др.). Продукт реакции стабилен в течение нескольких часов. Пептиды и белки, проявленные флуорескамином, могут использоваться для определения аминокислотного состава и аминокислотной последовательности.

При проявлении флуорескамином высушенную хроматограмму погружают в 3–5%-ный раствор пиридина¹³ в безводном ацетоне¹⁴. Высушивают 5 мин на воздухе. Затем ее опрыскивают из пульверизатора 0,001–0,005%-ным раствором флуорескамина в безводном ацетоне. Основной раствор флуорескамина (2 мг/мл безводного ацетона) может храниться при 4°C в течение нескольких месяцев. Рабочий раствор флуорескамина готовят из основного раствора: к 80 мл сухого ацетона добавляют 0,4 мл основного раствора. Продукт реакции имеет 2 максимума поглощения при 300 и 390 нм, максимум флуоресценции при 480 нм.

Флуорескамин и *o*-фталевый альдегид могут быть использованы для количественного определения белков и пептидов. При работе с флуорескамином белки открываются в количестве 0,05–0,5 мкг.

Для определения белков с помощью флуорескамина к анализируемому препарату, растворенному в 2 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (pH 7), добавляют 10 мкл ацетонового раствора флуорескамина

¹³ Пиридин кипятят и перегоняют над КОН, затем кипятят и перегоняют над нингидрином (2 г на 2 л). Температура кипения 159°C

¹⁴ Ацетон кипятят с КМnO₄ (5 г/л ацетона) 3–4 ч. Охлаждают, добавляют новую порцию КМnO₄ (2 г/л) и кипятят еще 1–2 ч. Ацетон выдерживают в течение ночи над свежесушенным CaCl₂ (2 г/л). Перегоняют над CaCl₂

(2 мг/мл), пробы перемешивают в течение 30 с и измеряют флуоресценцию при 475 нм на флуориметре. Длина волны возбуждения света 385 нм.

Специфические реакции на отдельные аминокислоты. Наряду с нингидриновым реактивом существуют и другие реагенты, дающие цветные продукты с некоторыми аминокислотами. Это свойство избирательного окрашивания часто используют в хроматографии для идентификации отдельных аминокислот. Так, для определения соединений с гуанидиновой группой (аргинин) используют *реакцию Сакагуши*. Хроматограмму смачивают 0,1%-ным раствором 8-оксихинолина в ацетоне и после ее подсушивания на воздухе слегка опрыскивают из пульверизатора раствором гипобромита (1 мл брома в 500 мл 0,5 н. NaOH). Наблюдается оранжевое окрашивание.

Реакция Эрлиха. Производные индола и оксиндола (триптофан, 5-окситриптофан, 5-окситриптамиин, 5-оксииндолуксусная кислота) с реактивом Эрлиха дают лиловую окраску. Хроматограмму погружают в раствор, состоящий из смеси 1 объема 10%-ного раствора диметиламинобензальдегида в концентрированной HCl с четырьмя объемами ацетона. Окраска развивается через 20 мин при комнатной температуре.

Реакция Паули. Соединения, содержащие имидазольное кольцо (гистидин, метилгистидин, гистамин, карнозин), а также тирозин, дают красно-оранжевое окрашивание после обработки diaзореактивом (с. 192). Хроматограмму из пульверизатора слегка опрыскивают сначала diaзореактивом, а затем 10%-ным раствором Na_2CO_3 . Окраска устойчива. Перечисленные реакции можно применять после проявления хроматограммы нингидрином.

Для обнаружения материала, имеющего пептидные связи, но не дающего нингидриновую реакцию (например, циклических пептидов), применяют *реакцию Райдона и Смита*. С этой целью хорошо высушенную хроматограмму смачивают в смеси спирта и эфира (1:1). Избыток растворителя удаляют фильтровальной бумагой. Влажную хроматограмму помещают в замкнутое пространство над свежеприготовленной смесью 10%-ной соляной кислоты и 1%-ным раствором KMnO_4 (1:1) на 5–15 мин. Погружают хроматограмму в смесь 0,05 н. раствора KI и насыщенного раствора о-толидина (или бензилина) в 2%-ной уксусной кислоте (1:1).

о-Толидин и бензидин токсичны, их набирают только пипеткой с грушей или автоматической пипеткой!

На месте пептидов и белков появляются синие пятна. Через 1–3 мин хроматограмму промывают 2%-ным раствором CH_3COOH и высушивают на воздухе. Окраска устойчива. Для пептидов эта реакция более чувствительна, чем нингидриновая. Реакцию дают также пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды и др.

Количественное определение аминокислот

Количественное содержание аминокислот рассчитывают по калибровочным графикам, построенным после хроматографирования стандартных растворов аминокислот, взятых в различных количествах. Для каждой аминокислоты строят свой калибровочный график. В ряд точек хроматограммы наносят стандартные растворы аминокислот в количестве 0,05–0,20 мкмоль каждой. В качестве стандартных растворов удобно пользоваться смесями аминокислот известного состава, хорошо разделяющимися в данных условиях и содержащими определен-

ные количества аминокислот. Этим требованиям удовлетворяют смеси а и б аминокислот-«свидетелей», используемые в качественной хроматографии (с. 128). Стандартные смеси готовят из 50 мМ стандартных растворов отдельных аминокислот, приготовленных на смеси муравьиная кислота — уксусная кислота — вода смешиванием по 1 мл (0,5 мл) раствора каждой аминокислоты. Стандартные растворы аминокислот наносят на ту же хроматограмму, что и опытные пробы. После проявления хроматограммы окрашенные участки обводят простым карандашом, вырезают, измельчают ножницами, помещают в пробирки и приливают 3—5 мл раствора для элюции. Пробы до колориметрирования необходимо периодически встряхивать и держать в темноте. Элюаты начинают колориметрировать, когда в раствор полностью переходит краска из наиболее интенсивно окрашенных пятен (обычно через 30—60 мин). Определение проводят при 500 нм. Для контроля вырезают чистый участок хроматограммы на том же уровне, что и проявленные пятна, и обрабатывают его так же, как и опытные пробы.

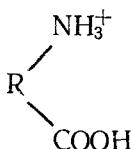
Содержание аминокислот выражают в молях на моль белка (число остатков аминокислоты на молекулу белка). Расчеты делают, исходя из взвешанной навески белка, его молекулярной массы и количества каждой аминокислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хроматография на бумаге/Под ред. И. Хайса, К. Мацека. М., 1962.
2. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге//Современные методы в биохимии/Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1964. Т. 1. С. 162.
3. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Под ред. О. Микеша. М., 1982. Т. 1.
4. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976. С. 187.
5. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1985.
6. Юферов В. П. О механизме нингидриновой реакции//Усп. биол. хим. 1971. Т. 12. С. 62.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот//Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981. С. 97.
8. Бэйли Дж. Методы химии белков. М., 1965. С. 9.

МЕТОД ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Разделение аминокислот этим методом проводят обычно на синтетических смолах-катионитах, представляющих собой сополимеры стирола с дивинилбензолом. Роль ионогенных группировок в них играют сульфогруппы ($-\text{SO}_3\text{H}$). Такие смолы являются сильными электролитами и диссоциируют при любых значениях pH на SO_3^- -ионы, прочно связанные со смолой, и противоионы H^+ , переходящие в раствор. Во избежание закисления буферных растворов, окружающих смолу, ионы H^+ в ней замещают на ионы Na^+ , т. е. используют смолу в форме SO_3Na . Для того чтобы осуществить сорбцию аминокислот на смоле путем обмена с ионами Na^+ , их переводят в форму катионов. С этой целью аминокислоты помещают обычно в Na-цитратный буферный раствор, pH 2,2. При этом значении pH все аминокислоты несут положительный заряд и находятся в виде катионов.



Степень прочности сорбции и десорбции на смоле разных аминокислот, определяемая главным образом величинами зарядов молекул, различна. Наиболее прочно на смоле сорбируются диаминокислоты и наименее прочно — дикарбоновые аминокислоты. Разделение аминокислот при ионообменной хроматографии происходит при десорбции их со смолы элюирующими буферными растворами, отличающимися от исходного буферного раствора большими величинами рН и (или) ионной силы. Обычно для элюции кислых и нейтральных аминокислот используют Na-цитратные буферные растворы с рН 3,25 и 4,25. Для десорбции со смолы наиболее прочно связанных (основных) аминокислот используют более щелочной Na-цитратный буферный раствор со значением рН 5,28 и более высокой ионной силой (0,35 М).

Разделение аминокислот и пептидов с помощью ионообменной хроматографии может быть осуществлено двумя способами: путем хроматографии на колонках и методом тонкослойной хроматографии.

Разделение аминокислот на колонках в настоящее время проводят автоматически в специальных приборах, называемых анализаторами аминокислот.

Современные анализаторы позволяют определять количества аминокислот, исчисляемые в пикомолях (3 пкмоль). Для работы на таких анализаторах требуется 0,1–1 нмоль белка. Время анализа 50 мин.

Хроматография на пластинках «Фиксион 50×8»¹⁵

Для разделения аминокислот (гидролизата белка) методом тонкослойной хроматографии широкое применение находят пластинки, покрытые тонким слоем ионообменной смолы полистирольной природы с сульфокислотными группировками (типа «Дауэкс 50×8») или ионообменной целлюлозой. Такие пластинки выпускаются промышленностью, например «Фиксион 50×8» (Венгрия), или могут быть приготовлены в лаборатории. В этих пластинках катионообменная смола находится в Na-форме. Пластинки стабильны в водных и органических растворителях, инертны по отношению к окислителям и восстановителям, но подвергаются воздействию щелочей и концентрированных кислот.

Сочетание при разделении на пластинках «Фиксион» процессов ионообменной и тонкослойной хроматографии обуславливает высокую разрешающую способность этого метода.

Пластинки могут быть использованы для разделения аминокислот, олигопептидов, аминов и др.

Реактивы (готовят на бидистиллированной воде):

1. Пластинки «Фиксион 50×8».
2. Лимонная кислота.
3. NaOH.
4. HCl — концентрированная.
5. Na₂HPO₄.
6. Этиловый спирт.
7. Нингидрин.
8. CH₃COOH — концентрированная.
9. HCOOH — концентрированная.
10. Глицерин.
11. Аминокислоты-«свидетели» — 50 мМ растворы.

¹⁵ Новое название пластинок «Фиксион» — «Лабиян».

Подготовка пластинок. Ионообменную смолу пластинок перед употреблением уравнивают соответствующим буфером¹⁶. Для этого пластинку «Фиксион» накладывают обратной стороной на стекло того же размера. На верхний край пластинки с помощью стеклянных палочек (или резинового кольца) прикрепляют 4 слоя фильтровальной бумаги, сложенной так, чтобы короткая часть (1,5–2 см) прикрывала слой смолы, а длинная часть была загнута на обратную сторону, т. е. к стеклу (рис. 18).

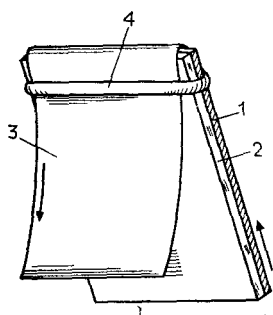


Рис. 18. Уравнивание пластинок «Фиксион» буферным раствором.
1 — пластинка; 2 — стекло, 3 — фильтровальная бумага; 4 — стеклянная палочка (или резиновое кольцо)

Пластинку вместе со стеклом помещают в камеру для восходящей хроматографии так, чтобы нижний край пластинки был погружен в буферный раствор на 1–1,5 см (пластинка должна быть расположена в камере под углом к поверхности буфера).

Уравнивание пластинок проводят в закрытой камере при комнатной температуре в течение 15–18 ч буферным раствором, pH 3,28 (0,02 М по Na^+) следующего состава: лимонная кислота — 1,4 г; NaOH —0,8 г; HCl концентрированная — 1,2 мл; вода — до 1 л.

По окончании уравнивания пластинки вынимают из камеры, снимают фильтровальную бумагу и высушивают их на воздухе. Пластинки можно хранить неограниченно долгое время.

Подготовка образца. pH образца должен быть ниже 3 (обычно его доводят до 2).

Сухой образец после кислотного гидролиза белка растворяют и наносят на пластинку в 0,01 н. растворе HCl ¹⁷. Щелочной гидролизат и стандарт триптофана (при анализе триптофана в этом гидролизате) наносят на пластинку в растворе, состоящем из 2 н. NaOH , натрий-цитратного буфера, pH 3,3 (0,4 М по Na^+) и 5,7 н. HCl , взятых в соотношении 2:1,6:1.

Сухой гидролизат (1–3 мг белка)¹⁸ растворяют так, чтобы конечная концентрация каждой аминокислоты составляла около 5 мМ. Эту величину подсчитывают, исходя из количества белка (в мкмольях), взятого на гидролиз, и среднего содержания в белке каждой из 20 аминокислот (сумма аминокислот в белке, деленная на 20). Количество аминокислот в белке определяют либо из данных литературы, либо разделив молекулярную массу белка на 100 (средняя молекулярная масса аминокислоты).

Растворы наносят на пластинку микрошприцами, микропипетками или калиброванными капиллярами (следует избегать повреждения слоя смолы) на стартовую линию, расположенную в 2–3 см от нижнего края пластинки, в виде пятна (диаметр не более 3 мм) или полосы. На пластинку наряду с опытной пробой наносят стандартные растворы аминокислот в том же растворителе, что и гидролизат, в коли-

¹⁶ При анализе смеси, состоящей из небольшого числа хорошо разделяемых аминокислот, пластинку можно не уравнивать буфером.

¹⁷ Образцы можно растворять в смеси $\text{HCOOH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ (7:5:13) или в фосфатно-цитратном буфере (0,7 мл 0,2 М раствора Na_2HPO_4 ; 19,6 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты; вода — до 200 мл).

¹⁸ При анализе щелочного гидролизата (с. 125) количество белка, подвергаемое гидролизу, выше и составляет около 10 мг.

честве 0,01—0,03 мкмоль каждой аминокислоты в пятне. Пластинку с нанесенным образцом помещают в хроматографическую камеру, на дно которой слоем 1 см наливают один из буферных растворов № 1—3.

Раствор № 1

На-цитратный буфер (0,4 М по Na^+), pH 3,3;

лимонная кислота	— 84 г;
NaOH	— 16 г;
HCl концентриро- ванная	— 5,9 мл;
H ₂ O	— до 1 л.

Раствор № 2

На-цитратный буфер (0,2 М по Na^+), pH 3,28;

лимонная кислота	— 14,1 г;
NaOH	— 8,0 г;
HCl концентриро- ванная	— 12,3 мл;
глицерин	— 100,0 мл;
H ₂ O	— до 1 л.

В растворах № 1 или № 2 хорошо разделяются следующие смеси аминокислот:

смесь А — аргинин, гистидин, тирозин, изолейцин, валин, аланин, глутаминовая кислота;

смесь Б — лизин, фенилаланин, лейцин, метионин, глицин, треонин, аспарагиновая кислота.

Их готовят смешиванием в равных объемах растворов аминокислот-«свидетелей» с концентрацией 50 мМ.

Для определения триптофана в щелочном гидролизате белка используют *раствор № 3*:

На-цитратный буфер (1,5 М по Na^+) pH, 6,0:

лимонная кислота	— 7 г;
NaOH	— 4 г;
NaCl	— 81,9 г;
H ₂ O	— до 1 л.

Разделение аминокислот проводят в закрытой камере, насыщенной парами растворителя, восходящим способом при 50° С. После окончания хроматографии (60—90 мин, растворитель должен подняться по пластинке на расстояние примерно 18 см) вынутую из камеры пластинку высушивают на воздухе и проявляют раствором нингидрина. Для этого пластинку осторожно опрыскивают из пульверизатора¹⁹ 0,1%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Для получения стойкой окраски хроматограмму можно проявлять нингидриновым реактивом, содержащим кадмий. Его готовят смешиванием в отношении 5:1 (по объему) двух растворов:

1) 1%-ного раствора нингидрина в ацетоне;

2) 1 г уксуснокислого кадмия в смеси, содержащей 50 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл воды.

Пластины проявляют в темноте при комнатной температуре или в термостате при 105° С (около 10 мин).

На пластинках «Фиксион 50×8» при однократном пропускании растворителя могут быть разделены 14—16 аминокислот, входящих в состав белка (рис. 19, А). В случае недостаточно хорошего разделения смеси аминокислот одномерным способом прибегают к двумерной хроматографии, пропуская тот же или другой растворитель в направлении, перпендикулярном предыдущему. На практике поступают следующим образом. В две точки стартовой линии хроматограммы на рас-

¹⁹ Пульверизатор должен обеспечивать мелкое распыление жидкости.

стоянии 2,5 см друг от друга и 1 см от края хроматограммы помещают исследуемый раствор. После однократного пропускания раствори-

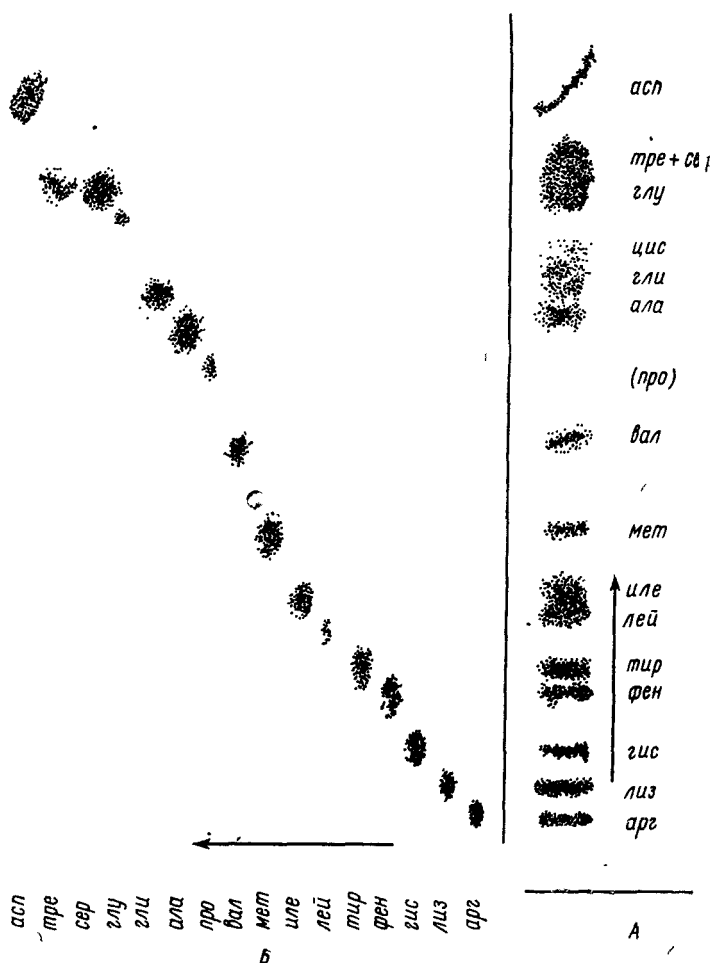


Рис. 19. Разделение стандартной смеси аминокислот на пластинках «Фиксион 50×8» (А — одномерное, Б — димерное)

теля пластинку высушивают, отрезают от нее часть, соответствующую крайней стартовой точке хроматограммы, и проявляют нингидрином. В случае плохого разделения оставшуюся большую часть пластинки поворачивают на 90° и снова помещают в тот же самый или другой растворитель. Проводят повторное хроматографирование во втором направлении. После высушивания пластинку проявляют нингидрином (рис. 19, Б).

Количественное определение аминокислот. Для оценки количественного содержания аминокислот в исследуемом образце белка наряду с гидролизатом в отдельные точки хроматограммы наносят растворы аминокислот-«свидетелей». Стандартные растворы аминокислот наносят в несколько (4–6) точек хроматограммы из расчета 0,01–0,06 мкмоль в пятно, триптофан — до 0,1 мкмоль.

После проявления нингидрином полосу хроматограммы, соответствующую каждой из аминокислот (в кислой системе растворителей — растворы № 1 или № 2 — лучше других разделяются пятна лизина, аргинина и валина), вырезают и сканируют на денситометре при 510 нм. Результаты сканирования оценивают либо по площадям полученных пиков, которые рассчитывают путем умножения высоты пика на его ширину на уровне половины высоты, либо по массам пиков. Для этого пики переводят на кальку. Пики на кальке вырезают и взвешивают. По этим данным строят калибровочный график зависимости площади пика (или его массы) от содержания аминокислоты (в микромолях).

Содержание аминокислот выражают в молях на моль белка (количество остатков на молекулу).

ЛИТЕРАТУРА

1. Жидкостная колоночная хроматография/Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. М., 1978. Т. 2.
2. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Под ред. О. Микеша. М., 1982. Т. 1, 2.
3. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976.
4. Козаренко Т. Д., Зуев С. Н., Муляр Н. Ф. Ионообменная хроматография аминокислот. Новосибирск, 1981.
5. Баратова Л. А., Белянова Л. П. Определение аминокислотного состава белков//Методы биохимического эксперимента. М., 1974. С. 3.
6. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985. С. 515.
7. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
8. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М., 1981. Т. 1.
9. Бейли Дж. Методы химии белков. М., 1965.
10. Хроматография. Практическое приложение метода/Под ред. Э. Хефтмана. М., 1986. Т. 1.
11. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков/Под ред. А. Нидервайзера, Г. Патаки. М., 1974.

МЕТОД СРЕДНЕВОЛЬТНОГО ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ

Аминокислоты в растворе находятся в виде цвиттерионов. Их заряд, определяемый степенью диссоциации карбоксильных, аминогрупп и боковых радикалов, зависит от рН раствора. Используя метод электрофореза на бумаге, удастся провести разделение определенных групп аминокислот. Сложные смеси аминокислот могут быть разделены с помощью электрофорезов, проводимых при разных значениях рН во взаимноперпендикулярных направлениях или комбинацией электрофореза и хроматографии.

Реактивы:

1. Буферный раствор. Муравьиная кислота — уксусная кислота — вода (52:29:919), рН 1,9 (не менее 2 л).
2. Аминокислоты-«свидетели» — 50 мМ растворы отдельных аминокислот в смеси муравьиная кислота — уксусная кислота — вода (7:5:13). Смесь А — равные объемы растворов тирозина, фенилаланина, глутаминовой кислоты, лейцина, серина, аланина, аргинина и лизина. Смесь Б — равные объемы растворов аспарагиновой кислоты, треонина, пролина, валина, аланина, глицина и гистидина.

3. Хроматографическая бумага: ватман 1, ватман 3 ММ, бумага FN3, FN4, FN5.
4. Раствор для окрашивания (с. 127).
5. Раствор для закрепления краски (с. 127).
6. Раствор для элюции аминокислот с электрофореграмм (с. 127).

Вырезают листы хроматографической бумаги размером 20×60 см²⁰. Размер электрофореграммы зависит от конструкции прибора (рис. 20).

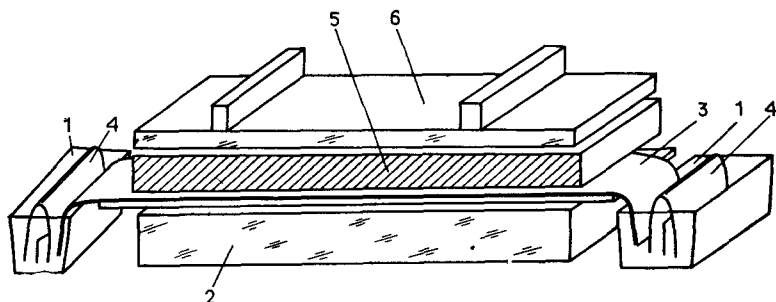


Рис. 20. Схема прибора для средневольтового электрофореза на бумаге: 1 — электродные отсеки; 2 — охлаждающая плита, 3 — пакет из полиэтилена, в котором находится хроматографическая бумага; 4 — фитиль из фильтровальной бумаги; 5 — подушка из поролона; 6 — прижимная крышка

На расстоянии 10–20 см от одного из краев бумаги простым карандашом проводят линию старта и отмечают на ней 5–6 точек с интервалом 2,5–3,5 см. Бумагу кладут на хроматографический стол или на две стеклянные палочки таким образом, чтобы линия старта оставалась на весу. В отмеченные на линии старта точки наносят исследуемый образец, а также растворы аминокислот-«свидетелей» или их смеси. Объем наносимого образца не должен превышать 20–60 мкл, при этом содержание каждой аминокислоты в пятне должно составлять 50–150 нмоль.

Образцы наносят на бумагу капилляром или микропипеткой, все время подсушивая зону нанесения. После нанесения образцов бумагу, начиная с краев, увлажняют буферным раствором. При этом следят за тем, чтобы бумага увлажнялась равномерно, а фронты буферного раствора, пропитывающего бумагу слева и справа от линии старта, сошлись бы точно на линии старта. Избыток буфера удаляют фильтровальной бумагой. Избыточное увлажнение бумаги ухудшает разделение. Бумагу помещают в специальный полиэтиленовый пакет и кладут на охлажденную плиту прибора для электрофореза. Контакты электрофореграммы с электродными отсеками обеспечиваются с помощью бумажных фитилей, смоченных в буферном растворе. Сверху на электрофореграмму накладывают подушку из поролона, которая специальной крышкой прижимает бумагу к охлаждающей плите и обеспечивает эффективное отведение тепла, выделяющегося при электрофорезе. Прибор закрывают крышкой из пластмассы и подключают к источнику тока. Электрофорез проводят в течение 1,5–2,5 ч при на-

²⁰ Все операции следует проводить в резиновых перчатках, чтобы исключить падение аминокислот с кожи пальцев на бумагу.

пряженности поля 20 В/см. После окончания электрофореза сушку, вынимают, высушивают в токе теплого воздуха и прокрашивают нингидрином так, как описано на с. 129.

При необходимости можно провести количественное определение некоторых аминокислот в исследуемом образце, например аланина и глицина, которые хорошо отделяются от других аминокислот. Для количественного определения аланина и глицина на электрофореграмму, помимо исследуемого образца, наносят разные количества этих аминокислот-«свидетелей» (20–140 нмоль). После окончания электрофореза, прокрашивания и фиксации вырезают пятна соответствующих аминокислот и обрабатывают их так, как описано на с. 132. Колориметрирование проводят при 500 нм и строят график зависимости оптической плотности от количества внесенной аминокислоты. Используя полученный график, определяют содержание глицина и аланина в исследуемом образце.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дэвени Т, Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976.
2. Прусик З. Электромиграционные методы//Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Под ред. О. Микеша. М., 1982. Т. 2. С. 679.
3. Croft L. R Handbook of protein sequence analysis. Chichester, 1978.

V. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ ДО ПЕПТИДОВ

При исследовании первичной структуры белка, а также для идентификации в них определенных аминокислотных остатков белковую молекулу сначала расщепляют по ограниченному числу мест на более мелкие фрагменты.

Использование протеаз с различной специфичностью и проведение химического гидролиза пептидных связей по разным аминокислотным остаткам позволяют получать перекрывающиеся фрагменты, анализ аминокислотной последовательности которых дает возможность определять первичную структуру целого белка.

Стадии гидролиза обычно предшествует денатурация, приводящая к разворачиванию белковой глобулы. Во избежание получения дополнительных «артефактных» пептидов за счет наличия или образования в процессе расщепления дисульфидных связей SH-группы в белке до гидролиза модифицируют различными способами (окисление надмуравьиной кислотой — с. 124, карбоксиметилирование, обработка тиосоединениями и др.).

Полученные гидролизаты анализируют различными методами: гель-хроматографией, ионообменной хроматографией, электрофорезом и хроматографией на бумаге и в тонком слое, электрофорезом в полиакриламидном геле, методом пептидных карт на бумаге или в тонком слое (в одном направлении пептиды подвергаются электрофорезу, в другом — хроматографии) и др. При этом пептиды, содержащие остатки аргинина, триптофана и гистидина, могут быть открыты с помощью специфических цветных реакций (с. 129). Выбор метода диктуется величиной (молекулярной массой) и характером пептидов гидролизата.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ТРИПСИНОМ

Трипсин²¹ расщепляет пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы лизина и аргинина. К гидролизу трипсином устойчивы связи лизина и аргинина с пролином (лиз—про и арг—про). Замедление гидролиза этим ферментом наблюдается тогда, когда остатки лизина и аргинина находятся рядом со свободными α -амино- и α -карбоксильными группами, а также в участках полипептидной цепи с повышенным содержанием основных аминокислот (связи лиз—лиз, арг—арг, лиз—арг и арг—лиз расщепляются только частично). Селективность расщепления трипсином можно повысить путем блокирования ϵ -NH₂-групп лизина (например, ангидридами янтарной, малеиновой или цитраконовой кислот) или же гуанидиновых группировок аргинина (дикетоновыми реагентами, такими как диацетил, циклогександион, фенилглиоксаль и др.). Гидролизу трипсином могут подвергаться связи, образованные и остатками цистеина, после превращения его в аминокэтилцистеин обработкой белка этиленимином.

Гидролиз трипсином проводят при 37°С в щелочной среде (рН 8,0—8,6). Для гидролиза удобно пользоваться «летучими» буферными растворами (после высушивания гидролизаты не содержат солей), например, раствором бикарбоната аммония. Постоянство рН среды поддерживают подщелачиванием 2 н. раствором NaOH. Время гидролиза (от 2 до 12 ч) зависит от природы анализируемого белка. Иногда время гидролиза увеличивают до 24 ч. Отношение фермента к белку 1:100 или 1:50 (по весу). При длительном гидролизе во избежание автолиза фермент нередко добавляют к субстрату двумя или тремя порциями.

Высокий процент в большинстве белков лизина и аргинина приводит при гидролизе трипсином к появлению сравнительно большого числа относительно мелких пептидов. Их анализируют методом пептидных карт на бумаге или в тонком слое, а также с помощью хроматографии на колонках и электрофорезом.

Действие трипсина можно изучить на примере расщепления белка мышц миокина, приводящего к образованию тяжелого меромиозина (с. 394).

РАСЩЕПЛЕНИЕ ХИМОТРИПСИНОМ

Химотрипсин преимущественно расщепляет пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы ароматических аминокислот. Кроме того, гидролизу химотрипсином могут быть подвергнуты связи, образованные лейцином, валином, метионином и аспарагином.

Гидролиз химотрипсином проводят при 37°С в щелочной среде (рН 8,0—8,6). Отношение фермента к белку 1:100 (по весу). При длительном гидролизе фермент к субстрату добавляют двумя или тремя порциями. Природа буфера, используемого для гидролиза, зависит от характера последующей работы. При разделении пептидов гидролизата хроматографическими и электрофоретическими методами на бу-

²¹ Препараты трипсина не должны содержать примесей химотрипсина. С этой целью продажные препараты трипсина обрабатывают ингибиторами химотрипсина, в частности дифенилкарбамилхлоридом или *N*-тозил-*L*-фенилаланилхлорметилкетонем (ТРСК).

маге или в тонком слое удобно пользоваться «летучими» буферными растворами, например 0,5%-ным раствором NH_4HCO_3 (pH 8,2). При гидролизе химотрипсином получают сравнительно мелкие пептиды.

Для изучения действия химотрипсина предлагается получить фрагменты миозина и провести их анализ (с. 396).

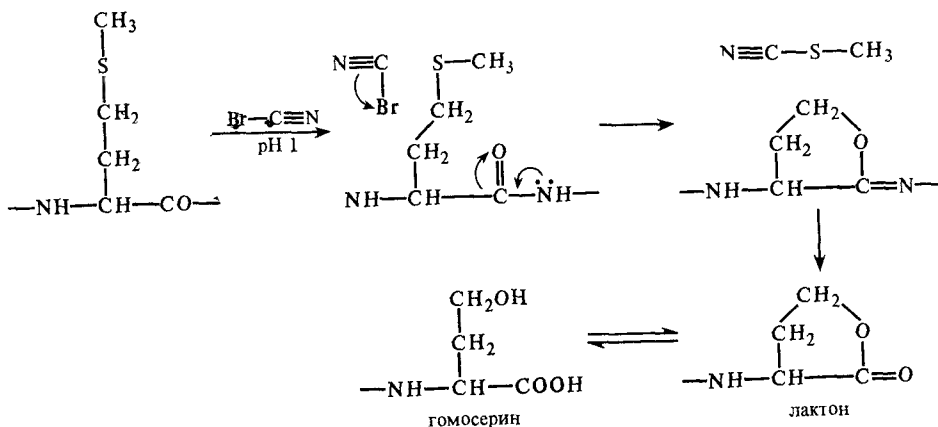
2. ХИМИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ

Полипептидные цепи при ферментативном гидролизе расщепляются на большое число сравнительно мелких пептидов, что затрудняет их разделение и идентификацию. Поэтому за последнее время все более широкое распространение приобретают методы химического расщепления пептидных связей, образованных аминокислотами, редко встречающимися в белках. Это позволяет получать ограниченное число крупных пептидов.

Среди методов расщепления полипептидных цепей химическим путем наибольшее распространение получили гидролиз белка по остаткам метионина (бромцианом), тирозина (N-бромсукцинимидом), триптофана (o-йодозобензойной кислотой и BNPS-скатолом) и по остаткам цистеина.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКАМ МЕТИОНИНА

Взаимодействие метионина с бромцианом и последующее расщепление полипептидной цепи протекает при сильно кислых значениях pH по схеме, представленной ниже:



Как видно из схемы, если расщепление происходит по одиночному остатку метионина внутри полипептидной цепи, то образуются 2 пептида, на С-конце одного из которых расположен остаток гомосерина. Если в полипептидной цепи есть 2 расположенных по соседству остатка метионина, то помимо двух пептидов образуется свободный гомосерин. Свободный гомосерин образуется и в том случае, если остаток метионина расположен на N-конце белка или пептида. Химическое расщепление полипептидной цепи бромцианом высокоспецифично и, как правило, протекает с высоким выходом.

Реактивы:

1. Муравьиная кислота или трифторуксусная кислота — 70%.
2. Сухой бромциан.

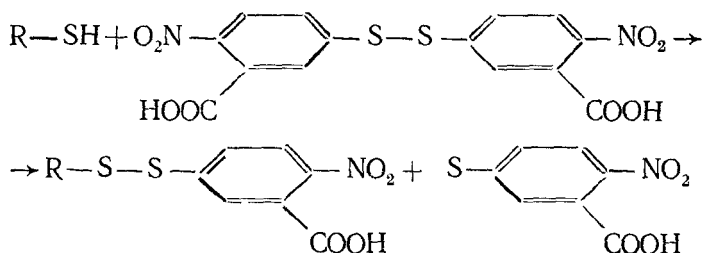
Исследуемый белок растворяют в 70%-ном растворе муравьиной или трифторуксусной кислоты (концентрация белка 5–10 мг/мл) и добавляют сухой бромциан в 30–200-кратном молярном избытке по отношению к содержанию метионина. Реакцию проводят в пробирке или колбе со шлифом под тягой при 25°C в течение 12 ч (при использовании трифторуксусной кислоты) или 24 ч (при использовании муравьиной кислоты). После окончания инкубации реакционную смесь разводят в 10–15 раз водой. При этом негидролизированный белок может выпадать в осадок и удаляется центрифугированием. Смесь пептидов подвергают лиофилизации или упаривают на роторном испарителе. Как видно из схемы, в результате расщепления полипептидной цепи на С-конце образующихся пептидов находится либо остаток гомосерина, либо гомосеринлактон. Для того чтобы перевести все С-концевые аминокислоты образующихся пептидов в лактонную форму, смесь пептидов инкубируют 1 ч в трифторуксусной кислоте при 25°C. Для перевода всех С-концевых аминокислот пептидов в форму гомосеринлактона смесь пептидов инкубируют 15 мин в 0,1%-ном растворе NH_4OH . Следует иметь в виду, что лактонная форма особенно удобна при определении первичной структуры белка на твердофазном секвенаторе.

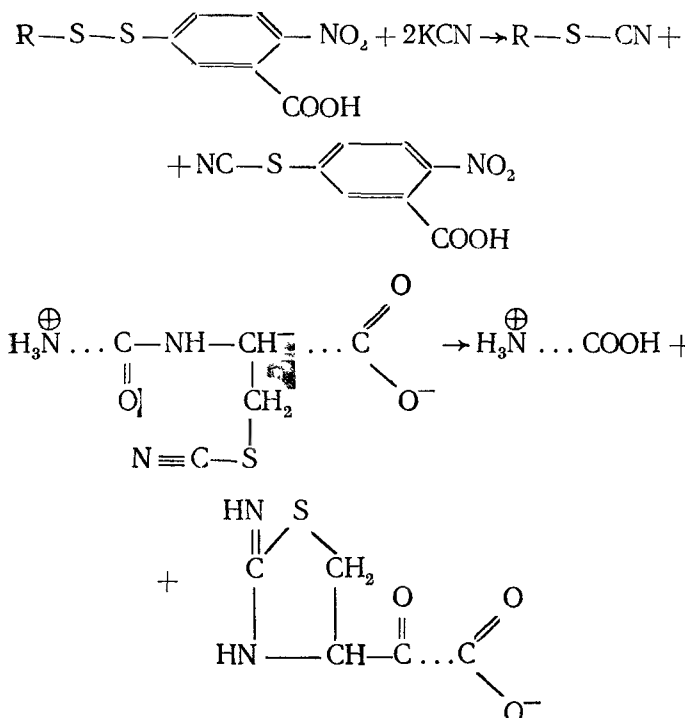
ЛИТЕРАТУРА

1. Дэвени Т, Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976. С. 170.
2. Croft L. R. Handbook of protein sequence analysis. Chichester, 1978. P. 19.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКАМ ЦИСТЕИНА

Метод расщепления состоит из следующих этапов: 1) остатки цистеина (или цистина) восстанавливают путем добавления избытка дитиотреитола; 2) сульфгидрильные группы модифицируют 5',5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ); 3) модифицированный белок обрабатывают избытком цианистого калия, в результате чего SH-группы в структуре белка превращаются в SCN-группы; 4) при щелочных значениях pH (pH 8–9) в присутствии 6–8 М растворов мочевины или гуанидинхлорида происходит разрыв полипептидной цепи вблизи остатков β-тиоцианоаланина (см. схему):





Полнота расщепления полипептидной цепи зависит от окружения модифицированных остатков цистеина. Если с остатками цистеина соседствуют остатки валина, пролина, лейцина, тирозина, лизина, аланина и аспарагиновой кислоты, то расщепление идет на 90–95%.

Реактивы:

1. Буферный раствор — 40 мМ трис-НСl (рН 8,0), 6 М мочевины, 2 мМ ЭДТА.
2. Дитиотреитол.
3. ДТНБ.
4. Цианистый калий.

Внимание! Цианистый калий является сильно действующим ядом. Все работы с этим реактивом проводить только под тягой в присутствии преподавателя.

Белок растворяют в таком объеме 40 мМ раствора № 1, чтобы конечная концентрация остатков цистеина составляла $1 \cdot 10^{-4}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ М. К раствору белка добавляют дитиотреитол до конечной концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ М и инкубируют 30 мин при 37°C. Далее к раствору белка добавляют раствор ДТНБ, приготовленный на том же буфере, до конечной концентрации, в 10 раз превышающей концентрацию SH-групп белка, и инкубируют 30 мин при 37°C. Модифицированный белок подвергают цианолизу, добавляя к инкубационной среде водный раствор цианистого калия до конечной концентрации, в 20 раз превышающей концентрацию ДТНБ в инкубационной среде. Полученную смесь инкубируют при 37°C в течение ночи. При необходимости по окончании инкубации образец можно обессолить на маленькой колонке с сефадексом G-50, уравновешенной 50–100 мМ бикарбонатом

аммония. Полноту расщепления можно проверить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Не рекомендуется проводить расщепление полипептидной цепи при $\text{pH} > 9$, так как в этих условиях ускоряется β -элиминирование тиоцианата. В том случае, если исследуемый белок содержит остатки цистина, для восстановления дисульфидных мостиков добавляют дитиотреитол до конечной концентрации 10 мМ и инкубируют 2 ч при 37°C, после чего проводят гель-фильтрацию или диализ, чтобы понизить концентрацию тиолов до $5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ М. Все последующие операции проводят, как это описано выше.

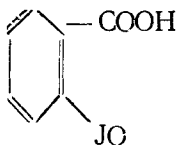
ЛИТЕРАТУРА

1. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М., 1977. С. 64, 77.
2. Degani Y., Patchornik A. Cyanylation of sulfhydryl groups by 2-nitro thiocyanobenzoic acid. High yield modification and cleavage of peptides at cysteine residue//Biochemistry. 1974. Vol. 13. P. 1.
3. Jacobson G. R., Schaffner M. H., Stark G. R. et al. Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues//J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248. P. 6583.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКАМ ТРИПТОФАНА

Известно несколько соединений, используемых для расщепления белка по остаткам триптофана: N-бромсукцинимид, BNPS-скатол (2-(2-нитрофенилсульфонил)-3-метил-3-броминдоленин), диметилсульф-оксид в соляной кислоте и *o*-йодозобензойная кислота²². Эти соединения действуют, как мягкие окислители триптофана. Однако механизмы реакций пока до конца не известны.

Наибольшей селективностью и эффективностью в отношении гидролиза пептидных связей, в образовании которых участвует триптофан, характеризуется *o*-йодозобензойная кислота:



Выход продуктов гидролиза колеблется от 70 (связи триптофана с валином и изолейцином) до 100% (связи со всеми остальными аминокислотами). При блокировании SH-групп в белках окислению при ее использовании подвергаются только остатки метионина. Селективность гидролиза зависит от качества используемого препарата: примеси в виде *o*-йодоксибензойной кислоты приводят к разрыву связей по остаткам тирозина. Для разрушения *o*-йодоксибензойной кислоты применяют *n*-крезол.

²² Большинство перечисленных реагентов обладает недостатками в отношении разрыва белковой молекулы по остаткам триптофана. Эффективность гидролиза при использовании BNPS-скатола, например, составляет всего 60%; увеличение его концентрации приводит к дополнительному разрыву триптофановых связей, однако при этом начинают гидролизироваться пептидные связи, образованные гистидином и тирозином.

Реактивы:

1. *o*-йодозобензойная кислота.
2. Гуанидинхлорид — 4 М раствор в 80%-ной уксусной кислоте.
3. *n*-крезол.
4. β -меркаптоэтанол.
5. CH_3COOH — 20%-ный раствор.

Сухой образец белка растворяют в минимальном объеме 4 М раствора гуанидинхлорида в 80%-ной уксусной кислоте (концентрация белка 1–10 мг/мл). К раствору белка добавляют *o*-йодозобензойную кислоту, предварительно растворенную в минимальном объеме того же раствора. Содержимое пробы преинкубируют с *n*-крезолом в течение 2–3 ч. Используют 0,2 моль *n*-крезола на 1 моль *o*-йодозобензойной кислоты. Белок и *o*-йодозобензойную кислоту берут в соотношении 1:2 (по весу). Гидролиз ведут в темноте при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакцию останавливают добавлением β -меркаптоэтанола. Реакционную смесь обессоливают на колонке (1,5×45 см) с сефадексом G-50 (fine), уравновешенной 20%-ным раствором уксусной кислоты. Гидролизат подвергают лиофилизации. Анализ полученного гидролизата проводят при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (с. 119).

ЛИТЕРАТУРА

Fontana A., Dalzoppo D., Grandi C. et al. Cleavage of Tryptophanyl Peptide Bonds by *o*-iodosobenzoic Acid//Methods in Enzymology. N. Y., 1983. Vol. 91. P. 311.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ И ПЕПТИДАХ

1. СВОБОДНЫЕ NH_2 -ГРУППЫ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Исследование концевых аминокислот в белках и пептидах играет важную роль в изучении как химической структуры, так и специфических биологических свойств этих соединений. Для определения N-концевых аминокислот широко используются динитрофторбензольный метод Сэнгера, фенилизотиоцианатный (метилизотиоцианатный) метод Эдмана и дансильный метод Грэя и Хартли.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ДИНИТРОФЕНИЛИРОВАНИЯ

В основе метода динитрофенилирования лежит реакция свободных NH_2 -групп белка или пептида с 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ) в щелочной среде, при которой образуются соответствующие динитрофенильные производные (ДНФ-производные). В реакцию с ДНФБ, кроме свободных α - NH_2 -групп, вступают также ε - NH_2 -группа лизина, SH-группа цистеина, OH-группы оксиаминокислот и имидазольный гетероцикл гистидина. ДНФ-производное белка или пептида подвергают полному кислотному гидролизу. N-концевые ДНФ-аминокислоты экстрагируют из гидролизатов эфиром, отделяя их от свободных аминокислот и ДНФ-производных по другим функциональным группам аминокислот, которые растворимы в воде. Идентификацию

ДНФ-производных аминокислот проводят с помощью электрофореза или хроматографии на бумаге или в тонком слое. Так как ДНФ-аминокислоты окрашены в желтый цвет, они не требуют дополнительного проявления на хроматограммах.

Реакцию белков и пептидов с ДНФБ и все последующие манипуляции следует проводить в темноте, так как ДНФ-производные на свету разлагаются. Необходимо также учитывать, что ДНФ-аминокислоты разрушаются и при кислотном гидролизе (особенно сильно разрушаются ДНФ-производные глицина, пролина, оксипролина, цистеина, триптофана, что требует дифференциальных условий гидролиза).

Определение N-концевой аминокислоты глутатиона

Реактивы:

1. 2,4-Динитрофторбензол — 2%-ный раствор в этиловом спирте.
2. NaHCO_3 — 1- и 10%-ные растворы.
3. Смесь этилового спирта и эфира (1:1).
4. HCl перегнанная (с. 124) — 5,7 н. раствор.
5. Эфир, освобожденный от перекисей (добавляется закисное сернистое железо, хранить на холоде).
6. Аммиак, уд. в. 0,8.
7. 2,4-Динитрофенол.
8. *n*-Бутиловый спирт, насыщенный 0,1%-ным раствором аммиака.
9. Спирт этиловый.
10. Пластинки «Силуфол».
11. ДНФ — аминокислоты-«свидетели».

Получение ДНФ-производного и его гидролиз. В центрифужную пробирку помещают 5–10 мг восстановленного глутатиона, добавляют 1 мл 10%-ного раствора NaHCO_3 и 0,5 мл 2%-ного раствора ДНФБ. Смесь перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 4 ч, периодически встряхивая.

ДНФ-производное глутатиона отделяют от избытка ДНФБ и соды добавлением 2–3 объемов этилового спирта и центрифугированием в течение 5 мин при 300 об/мин. Осадок промывают подкисленным этиловым спиртом (рН 3–4), затем дважды смесью спирта с эфиром и дважды эфиром. Осадок высушивают на воздухе под тягой, а затем в вакуум-эксикаторе над NaOH .

Осадок ДНФ-производного пептида переносят в ампулу, добавляют 1 мл 5,7 н. HCl (перегнанной), отсасывают воздух и запаивают (с. 124). Препарат гидролизуют в течение 8 ч при 105°C. Гидролизат переносят в пробирку с притертой пробкой, разбавляют 1–2 объемами воды и экстрагируют ДНФ-производные аминокислот эфиром, свободным от перекисей. Экстракцию проводят 2–3 мл эфира несколько раз. Эфирный слой осторожно отсасывают капилляром в маленький стаканчик. После испарения эфира осадок растворяют в небольшом количестве ацетона и исследуют методом хроматографии. Оставшийся после экстракции эфиром водный раствор может быть использован для хроматографического определения водорастворимых ДНФ-производных аминокислот.

Хроматография и количественное определение. При хроматографии на бумаге разделение проводят восходящим способом, используя в качестве растворителя бутанол, насыщенный 0,1%-ным раствором аммиака. Пропускание растворителя продолжают 15–20 ч. Для иден-

тификации ДНФ-аминокислот. После идентификации пятна ДНФ-аминокислот вырезают, экстрагируют 4 мл 1%-ного раствора NaHCO_3 и измеряют оптическую плотность при 360 нм (380 нм для пролина).

Предварительно определяют величину коэффициента молярной экстинкции раствора ДНФ, приготовленного на 1%-ном растворе соды. По его величине и найденной оптической плотности для ДНФ-аминокислоты рассчитывают содержание концевых аминокислот.

При использовании метода тонкослойной хроматографии разделение проводят на пластинках, покрытых силикагелем. Их можно приготовить в лаборатории (на поверхность стекла тонким слоем наносят суспензию силикагеля в воде) (с. 72). Разделение ДНФ-производных аминокислот можно проводить также на готовых стандартных пластинках, например «Силуфол». Размеры камеры определяются размером пластинки.

В качестве растворителя используют *n*-бутанол, насыщенный 0,1%-ным раствором аммиака. Разделение водорастворимых ДНФ-аминокислот можно провести в системе пропанол — аммиак (7:3)²³. Исследуемый гидролизат ДНФ-производного белка или пептида и растворы ДНФ-аминокислот-«свидетелей» наносят на линию старта, расположенную на расстоянии 1,5–2 см от нижнего края пластинки. Расстояние между точками — от 1 до 1,5 см. Диаметр наносимых пятен не должен превышать 2 мм. Пропускание растворителя продолжают приблизительно 50 мин (растворитель должен дойти до верхнего края пластинки). Во время хроматографирования камеру нужно закрыть черной бумагой. После высушивания пластинок на воздухе анализируемые ДНФ-аминокислоты идентифицируют путем сравнения положения их пятен с положением пятен ДНФ-аминокислот-«свидетелей».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СВОБОДНЫХ NH_2 -ГРУПП В ПЕПТИДАХ (АМИНОКИСЛОТАХ) МЕТОДОМ ЧАСТИЧНОГО ДИНИТРОФЕНИЛИРОВАНИЯ

Исследуемое вещество (пептид, аминокислота, аминокислоты) вводят в реакцию с различными количествами ДНФБ (например, на 1 эквивалент исследуемого соединения берут 1/4, 1/2, 1 и 2 эквивалента ДНФБ). В результате реакции образуются продукты различной степени замещения по аминогруппам, которые легко могут быть разделены методами электрофореза и бумажной или тонкослойной хроматографии. По числу ДНФ-производных судят о числе свободных NH_2 -групп в исследуемом соединении.

Определение числа свободных NH_2 -групп в лизине

Реактивы:

1. Лизин·HCl — 10 мг/мл ($\sim 0,1$ мэкв/мл по NH_2 -группе).
2. 2,4-Динитрофторбензол (ДНФБ) — 2%-ный ($\sim 0,1$ мэкв/мл) раствор в этиловом спирте.

²³ О других системах растворителей см.: Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976; Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. М., 1965.

5. триэтиламин, перемешанный.

4. *n*-Бутиловый спирт, насыщенный 0,1%-ным раствором аммиака.

5. Нингидрин — 0,2%-ный раствор в ацетоне

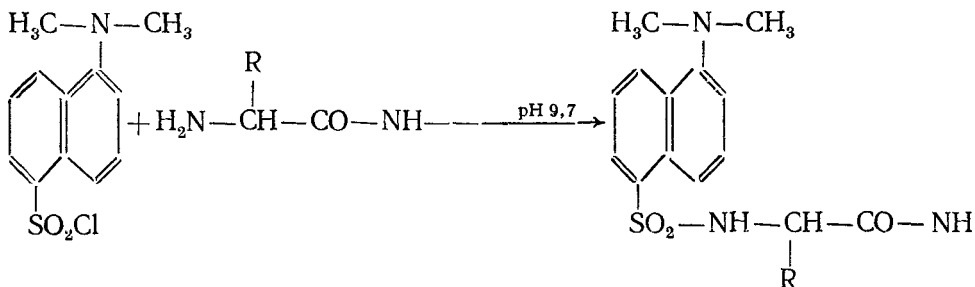
6. NaHCO_3 — 1%-ный раствор.

В 2 пробирки вносят по 0,5 мл раствора лизина, что соответствует 0,05 мэкв. В первую пробирку добавляют 0,25 мл (0,025 мэкв), а во вторую — 1 мл (0,1 мэкв) раствора ДНФБ, в результате чего соотношение реагирующих количеств лизина и ДНФБ в 1-й пробирке соответствует 1:0,5, а во 2-й — 1:2. В обе пробирки добавляют с помощью капилляра по одной капле триэтиламина и реакционные смеси инкубируют при 37°C в течение 30–45 мин, периодически встряхивая. После инкубации реакционные смеси исследуют методом бумажной или тонкослойной хроматографии.

В качестве свидетелей используют свободный ДНФ, а также моно- и ди-ДНФ-производные лизина. Эти соединения окрашены в желтый цвет и определение их локализации на хроматограмме не требует специальной обработки. Для обнаружения свободного лизина хроматограммы обрабатывают нингидрином (с. 129). В указанных условиях хроматографирования свободный лизин располагается вблизи линии старта, далее в порядке удаления от нее следуют: моно-ДНФ-производное лизина (ϵ - NH_2 -ДНФ-лизин), имеющее после обработки нингидрином буро-коричневое окрашивание, свободный ДНФ и ди-ДНФ-производное лизина. Для количественного определения моно- и ди-ДНФ-производных лизина соответствующие участки хроматограммы вырезают, элюируют 1%-ным раствором NaHCO_3 и измеряют оптическую плотность элюатов при 360 нм.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ ДАНСИЛЬНЫМ МЕТОДОМ

Аминогруппы белков и пептидов при щелочных значениях pH взаимодействуют с флуоресцентным красителем диметиламинонафта-ленсульфонилхлоридом (дансилхлоридом, DNC-Cl):



Помимо α - и ϵ -аминогрупп дансилхлорид вступает в реакцию с OH-группами тирозина, SH-группами цистеина и имидазольными кольцами гистидина (два последних соединения неустойчивы при щелочных значениях pH), а также с аммиаком, растворенным в воде. При взаимодействии DNC-Cl с аммиаком образуется дансилсульфо-намид (DNC-NH_2). При щелочных значениях pH, дансилхлорид подвергается гидролизу с образованием дансилсульфоновой кислоты (DNC-OH). После окончания реакции дансильирования модифицированный белок или пептид подвергают кислотному гидролизу. Боль-

а также ДНС—NH₂ и ДНС—ОН достаточно стабильны при гидролизе в 6 н. HCl при 105°C в течение 4—10 ч. Однако в указанных условиях полностью разрушается ДНС-триптофан, частично разрушаются дансильные производные метионина, карбоксиметилцистеина и пролина. Для надежной идентификации трех последних соединений следует уменьшать время гидролиза до 4 ч. С другой стороны, вследствие того, что пептидные связи, образованные остатками алифатических аминокислот (валина, лейцина, изолейцина), обладают большой устойчивостью к кислотному гидролизу, в ходе кратковременного гидролиза они разрываются не полностью. Это может приводить к образованию дансильрованных дипептидов и усложнять интерпретацию получаемых результатов. Чтобы избежать указанных трудностей, дансильрованный образец белка или пептида делят на две пробы, одну из которых гидролизуют в течение короткого (4 ч), а другую — в течение продолжительного (10—16 ч) времени. ДНС-аминокислоты (так же, как ДНС—ОН и ДНС—NH₂) обладают интенсивной флуоресценцией (максимум возбуждения около ~370 нм), что обеспечивает высокую чувствительность описываемого метода.

Реактивы:

1. NaHCO₃ — 0,2 М раствор.
2. Раствор дансилхлорида в ацетоне — 2 мг/мл. Указанный раствор не следует долго хранить.
3. HCl — 5,7 н. раствор, перегнанная (с. 124).

Реакцию проводят в маленьких пробирках (высота 40—45 мм, внутренний диаметр 3—4 мм) или в специальных пробирках, снабженных шлифом с краном. Образец пептида или белка (10—20 нмоль) вносят капилляром на дно пробирки. Содержимое пробирки высушивают в вакуум-эксикаторе. В пробирку добавляют 10—20 мкл 0,2 М раствора NaHCO₃ и снова высушивают в вакуум-эксикаторе. Цель высушивания состоит в удалении следов аммиака, мешающего проведению реакции. К высушенному образцу добавляют равные объемы (10—20 мкл) бидистиллированной воды, свободной от аммиака, и ДНС—Cl в ацетоне и инкубируют при 37°C 30—40 мин. Об окончании реакции можно судить по исчезновению желтой окраски раствора. Образец помещают в вакуум-эксикатор и упаривают досуха. Добавляют 30—60 мкл 5,7 н. HCl, после чего пробирки без шлифов запаивают, а пробирки со шлифом и краном подключают к вакуумному насосу, вакуумируют и герметически закрывают. Образцы подвергают гидролизу при 105°C в течение 4—18 ч. Пробирки охлаждают, вскрывают, образец высушивают досуха в вакуум-эксикаторе или на роторном испарителе. Описанная процедура разработана для пептидов и небольших белков, хорошо растворимых в воде или растворах бикарбоната натрия. Если белок не растворяется в этих условиях, дансильрование можно проводить в 0,2 М растворе NaHCO₃, содержащем 0,1%-ный додецилсульфат натрия. В этом случае, однако, возникает необходимость удаления додецилсульфата натрия до проведения кислотного гидролиза. Этого можно достичь, осаждая дансильрованный белок 2—3-кратным объемом ацетона и последующей 2—3-кратной отмывкой осадка ацетоном.

Для идентификации ДНС-аминокислот используют методы высоко- и средневольтного электрофореза на бумаге, тонкослойной хро-

а также высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления (ЖХВД). В зависимости от используемого метода удается детектировать от $1 \cdot 10^{-10}$ моль (метод ЖХВД) до $5 \cdot 10^{-9}$ моль (электрофорез на бумаге) дансированных производных, что обеспечивает более чем 100-кратное повышение чувствительности по сравнению с определением N-концевых аминокислот методом динитрофенилирования (см. выше).

На электрофореграммах и тонкослойных пластинках все ДНС-аминокислоты и ДНС- NH_2 видны в виде ярко-желтых пятен, ДНС-ОН — в виде ярко-голубого пятна.

Идентификация ДНС-аминокислот с помощью электрофореза на бумаге

Реактивы:

1. Аммонийно-ацетатный буфер, рН 4,38. 32 мл ледяной уксусной кислоты смешивают с 1,9 л воды и доводят рН до 4,38 раствором аммиака. Объем буфера доводят до 2 л.
2. ДНС-аминокислоты-«свидетели» — 0,5–0,8 мг/мл в смеси ацетон — 1 н. HCl в соотношении 9 : 1.
3. Бумага хроматографическая (ватман 1, FN 15), размер 20×60 см.

Сухую бумагу размечают так, что линия старта находится на расстоянии одной трети (20 см) от катода. Гидролизат, растворенный в смеси ацетон — 1 н. HCl или в 50%-ном растворе пиридина, наносят на сухую бумагу в минимальном объеме (10–20 мкл). С обеих сторон от образца-гидролизата на расстоянии 2–3 см наносят образцы отдельных ДНС-аминокислот-«свидетелей», а также 2 стандартные смеси ДНС-аминокислот. Смесь А состоит из ДНС-производных аспарагиновой кислоты, пролина, треонина, валина, фенилаланина, бис-ДНС-лизина, α -ДНС-лизина, ϵ -ДНС-лизина и ДНС- NH_2 . Смесь Б состоит из ДНС-производных цистеиновой кислоты, глицина, глутаминовой кислоты, серина, аланина, лейцина, изолейцина, тистидина, аргинина, α -ДНС-тирозина, o - и бис-ДНС-тирозина. На бумагу необходимо нанести не менее 1–5 нмоль каждой из ДНС-аминокислот. После нанесения образцов бумагу увлажняют буфером (с. 138), помещают в прибор для средневольтного электрофореза с источником пи-

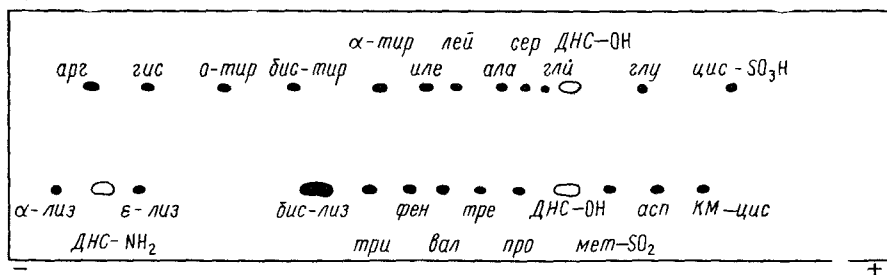


Рис. 21. Схема расположения ДНС-аминокислот после электрофореза на бумаге

тания (1500 В, 500 мА) (см. рис. 20) и проводят электрофорез при напряжении 1500 В (напряженность 25 В/см) в течение 6–8 ч. После

окончания электрофореза бумагу тщательно высушивают в токе теплого воздуха, а затем в сушильном шкафу при 100°C и просматривают под ультрамикроскопом. Все ДНС-аминокислоты, входящие в смеси А и Б, хорошо отделяются друг от друга. В то же время в сложных смесях плохо разделяются ДНС-аспарагиновая и ДНС-глутаминовая кислоты, группа ДНС-серин, ДНС-глицин и ДНС-аланин, группа ДНС-валин, ДНС-изолейцин, ДНС-фенилаланин, а также пары ДНС-гистидин и ϵ -ДНС-лизин, ДНС-аргинин и ДНС-NH₂ (рис. 21). Группы плохо разделяемых производных удается разделить с помощью повторного электрофореза при pH 1,9 (смесь, содержащая 2,5% муравьиной и 7,5% уксусной кислоты).

Идентификация ДНС-аминокислот методом тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых силикагелем

Реактивы²⁴:

1. Растворитель 1 — ацетон—изопропанол—25%-ный аммиак (18:14:1).
2. Растворитель 2 — ацетон—изопропанол — 25%-ный аммиак (18:14:1,4).
3. Растворитель 3 — хлороформ—бензиловый спирт—этилацетат—уксусная кислота (30:20:25:1).
4. ДНС-аминокислоты-«свидетели».
5. Силикагель марки КСК-200 меш. (с. 70).
6. CaSO₄ (гипс) (с. 72).

Приготовление пластин. Первый способ. 0,2 г силикагеля тщательно растирают в ступке с 1 мл воды и 100 мг гипса. К полученной пасте добавляют еще 0,8 мл воды и вновь растирают. Полученную однородную суспензию выливают на вымытую и обезжиренную с помощью детергента стеклянную пластинку 6×6 см. Пластинку устанавливают на столик с горизонтальной поверхностью и высушивают в течение ночи на воздухе.

Второй способ. Пластинку погружают в суспензию с легколетучим растворителем. Суспензию силикагеля в хлороформе в соотношении 1:4 с добавкой 5% гипса гомогенизируют 4—5 мин. Тщательно вымытые обезжиренные пластинки погружают в суспензию 2—3 раза, устанавливают на столике с горизонтальной поверхностью и высушивают 5—10 мин на воздухе при комнатной температуре. Затем пластинку с одной стороны очищают от силикагеля.

Разделение ДНС-аминокислот. Разделение проводят на пластинках размером 6×6 см, которые предварительно активируют в термостате при 120°C в течение 30 мин. Анализируемые образцы наносят тонким капилляром в угол пластинки на расстоянии 1 см от ее краев. Диаметр наносимых пятен не должен превышать 0,3—0,5 мм. Объем проб — около 0,5 мкл. На первую пластинку наносят 4-часовой гидролизат, на вторую — 16-часовой, на третью пластинку — смесь ДНС-аминокислот-«свидетелей». Обычно берут стандартные растворы ДНС-производных тех аминокислот, которые входят в состав данного пептида. Пластинки помещают в камеру и проводят разделение вос-

²⁴ Все растворители предварительно очищают и перегоняют. Очистку реактивов см. в кн.: Препаративная органическая химия/Под ред. Н. С. Вульфсона. М., 1959.

ходящим способом сначала в растворителе 1, после этого пластинку выдерживают под тягой в течение 2–3 мин и хроматографируют в том же направлении в растворителе 2. Далее пластинку высушивают в течение 5 мин при 105°C и хроматографируют в перпендикулярном направлении в растворителе 3. Хроматограмму высушивают при 107°C. ДНС-аминокислоты обнаруживают при освещении пластинок ультрафиолетовым светом (с. 149). Пятна переводят на кальку и идентифицируют путем сравнения с пластинками, на которых хроматографировали ДНС-аминокислоты-«свидетели».

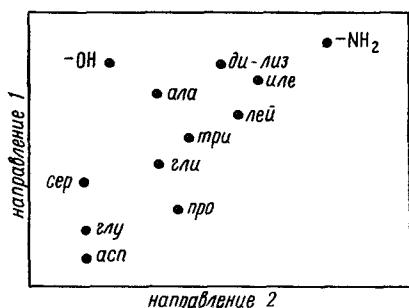


Рис. 22. Схема распределения ДНС-аминокислот на пластинках с силикагелем

В описанных условиях хорошо разделяется смесь следующих ДНС-аминокислот: асп, глу, про, сер, гли, три, ала, ди-лиз, лей, иле, ДНС-ОН и ДНС-NH₂ (рис. 22).

Идентификация ДНС-аминокислот методом тонкослойной хроматографии на полиамидных пластинах

Используемые в работе пластины покрыты слоем полиамида с обеих сторон. Они полупрозрачны, что делает возможным нанесение на одну сторону пластины смеси аминокислот-«свидетелей», а на другую — анализируемого образца. После проведения хроматографии пластины просматривают под ультрамикроскопом и идентифицируют пятна, обладающие подвижностью, одинаковой с подвижностью аминокислот-«свидетелей».

Пластины можно использовать многократно. Полиамидные пластины выпускаются промышленностью, но их можно приготовить в лабораторных условиях нанесением слоя полиамида на лавсановую пленку.

Приготовление пластин

Реактивы:

1. Полиамид.
2. Лавсановая пленка.
3. НСООН — концентрированная.

К 88,2 мл перегнанной НСООН добавляют при встряхивании или перемешивании на магнитной мешалке несколькими порциями 22 г полиамида. Для полного растворения полиамида (5–6 ч) добавляют еще 12,5 мл воды (выпадающий осадок в виде белой пленки при дальнейшем перемешивании растворяется).

Лавсановую пленку (40×10 см толщиной 75 мк) обрабатывают наждачной бумагой № 1 до получения матовой поверхности, затем протирают спиртом.

Раствор полиамида выливают в чашку Петри (или кювету) и пленку медленно протаскивают через этот вязкий раствор. Пленку подвешивают над кюветой на 3–5 мин для стекания избыточного раствора,

а затем помещают в камеру, насыщенную парами воды. Затем пленку вынимают из камеры и высушивают на воздухе в течение 2–3 ч.

Разделение ДНС-аминокислот

Реактивы:

1. Растворитель 1 — 1,75%-ный раствор муравьиной кислоты.
2. Растворитель 2 — толуол-уксусная кислота (9:1).
3. Растворитель 3 — этилацетат-метанол-уксусная кислота (30:1:1).
4. ДНС-аминокислоты-«свидетели».
5. Полиамидные пластины размером 5×5 см.

В одном из углов пластины на расстоянии ~1 см от краев намечают простым карандашом точку старта. Такую же точку ставят с противоположной стороны пластины. Необходимо, чтобы эти точки совпадали. В точку на одной стороне пластины наносят смесь стандартов, а в точку на другой стороне — анализируемый образец. Образец и стандарты наносят в минимальном объеме — 5–10 мкл, постоянно подсушивая место нанесения струей теплого воздуха. Наносят от 0,5 до 3 нмоль дансированных аминокислот. Пластины ставят в маленькую хроматографическую камеру, следя за тем, чтобы она не касалась стенок камеры, и хроматографируют в растворителе 1. Пластины высушивают в струе теплого воздуха в течение 30 мин и хроматографируют в перпендикулярном направлении в растворителе 2. После высушивания пластины просматривают под ультрафиолетом. Обычно описанная процедура обеспечивает разделение почти всех ДНС-аминокислот (рис. 23).

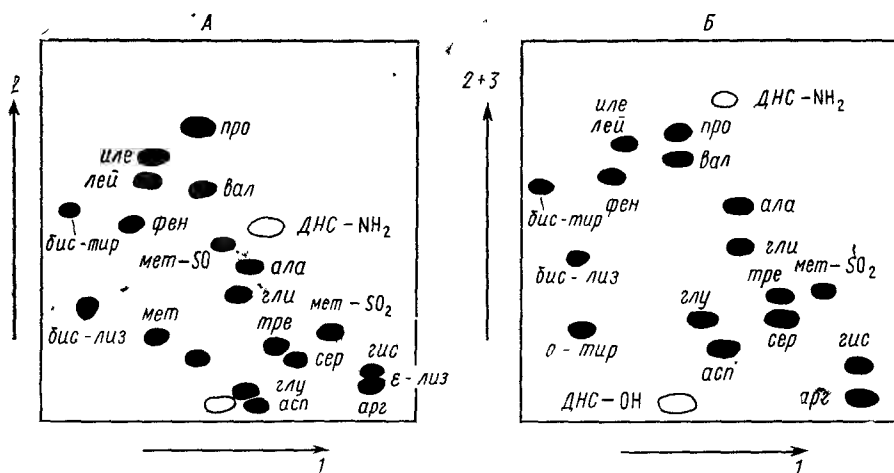


Рис. 23. Расположение дансированных аминокислот на полиамидной пластине после хроматографии в двух (1, 2 — на А) или трех (1–3 — на Б) системах растворителей

Для более полного разделения дансированных производных треонина и серина, а также производных аспарагиновой и глутаминовой кислот проводят хроматографию в растворителе 3, в том же направлении, в котором проводили хроматографию в растворителе 2.

Регенерация пластин для повторного использования. Пластинки нанизывают на белую нитку и погружают в камеру, заполненную смесью муравьиная кислота — ацетон (1:9) или 1 М NH_4OH , приготовленным на 50%-ном ацетоне. Необходимо следить, чтобы пластинки не слипались и не прикасались к стенкам камеры. Омывающий раствор желательно постоянно перемешивать. Через 3—5 ч пластинки просматривают под ультрафиолетом и если они достаточно чисты, их высушивают на воздухе. Необходимо отмывать пластинки сразу после проведения эксперимента, так как «застарелые» пластинки плохо отмываются и не могут быть использованы повторно. При работе на отмытых пластинках рекомендуется сохранять использовавшееся в предыдущих экспериментах направление движения растворителей и нанести смесь стандартов на одну и ту же сторону пластины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976.
2. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот./Под ред. М. А. Прокофьева. М., 1985.
3. Решетов П. Д. Получение полиамидной пленки//Химия природных соединений. М., 1971. Т. 1. С. 66.
4. Бэйли Дж. Методы химии белков. М., 1965. С. 136.
5. Croft L. R. Handbook of protein sequence analysis. Chichester, 1980.
6. Levina N. B., Nazimov I. V. High-performance liquid chromatography of DNS-amino acids in the purity control of peptides//J. Chromatogr. 1984. Vol. 286. P. 207.

2. С-КОНЦЕВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В БЕЛКАХ И ПЕПТИДАХ

Для определения С-концевых аминокислот в белках и пептидах используют как химические, так и ферментативные методы.

Химические методы основаны главным образом на модификации С-концевых аминокислот. После полного гидролиза полипептидной цепи эти производные отделяют от немодифицированных остатков и идентифицируют. К химической группе методов относятся гидразинолиз, отщепление С-концевых аминокислот под действием изотиоцианата аммония и восстановление этерифицированных белков и пептидов алюмогидридом лития.

При определении С-концевых аминокислот ферментативным путем используют карбоксипептидазы А, В, С и У. Карбоксипептидаза А при рН 8,0²⁵ отщепляет все аминокислоты кроме лизина, аргинина и пролина; карбоксипептидаза В при рН 8,0 отщепляет только лизин и аргинин; карбоксипептидаза С при рН 3,5 отщепляет кислые, нейтральные и основные аминокислоты, включая пролин; карбоксипептидаза У при рН 6,0 отщепляет все С-концевые аминокислоты, включая пролин.

Расщепление белков под действием карбоксипептидаз, а также изотиоцианатом аммония используют и с целью определения С-концевой последовательности белков и пептидов. Обычно перед использованием препараты карбоксипептидаз тщательно освобождают от примесей свободных аминокислот, а также производят специальную обработку с целью ингибирования эндопептидаз.

²⁵ Для увеличения скорости отщепления остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот карбоксипептидазой А рекомендуется проводить гидролиз при рН 4,7.

Реактивы:

1. Карбоксипептидаза А, свободная от примесей аминокислот и эндопептидаз.
2. Исследуемые белки или пептиды (рибонуклеаза, лизоцим).
3. Аммоний-бикарбонатный буфер 0,2 М или триэтиламмонийбикарбонатный буфер 0,05 М рН 8,0—8,1.
4. Уксусная кислота — 30%-ный раствор.
5. Трихлоруксусная кислота.
6. Ацетон.
7. Реактивы для проведения реакции дансирования аминокислот (с. 149) или реактивы для определения аминокислот с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах «Фиксион» (с. 133).

Обработка препарата карбоксипептидазы. Для удаления свободных аминокислот суспензию кристаллов карбоксипептидазы А (20 мг/мл) разводят в 4 раза холодной водой и центрифугируют при 2000 g 5 мин при температуре 3—5°C. Супернатант отбрасывают, промывание водой повторяют 2—3 раза. Если препарат фермента не освобожден от примеси эндопептидаз, проводят следующую обработку. Отмытые кристаллы карбоксипептидазы А (около 400 мкг в 20 мкл) суспендируют в 0,1 мл 0,1 М раствора NaCl и на холоде при встряхивании добавляют 20 мкл 0,1 н. раствора NaOH. При этом величина рН становится равной 9,0 и кристаллы растворяются. К полученному образцу добавляют 0,4 мл 0,2 М раствора NH_4HCO_3 (рН 8,0) и 20 мкл 2%-ного раствора диизопропилфторфосфата в изопропанол. Диизопропилфторфосфат высокотоксичен и может быть заменен менее токсичным фенилметилсульфонилфторидом. Полученную смесь инкубируют при 37°C в течение 30 мин, охлаждают и хранят в холодильнике.

Если препарат карбоксипептидазы уже освобожден от примеси эндопептидаз, обработку диизопропилфторфосфатом следует опустить. В этом случае кристаллы карбоксипептидазы А (5 мг) суспендируют в 0,1 М растворе NaCl (4—4,5 мл) и растворяют путем осторожного добавления 0,1 н. раствора NaOH. В связи с тем что карбоксипептидазы А и В являются металлоферментами, в ряде методик рекомендуют добавлять к раствору фермента, полученному по вышеуказанному способу, 0,5 мл 0,1 н. раствора CoCl_2 и выдерживать раствор при 25°C в течение 10 мин. Концентрацию фермента можно определить, измерив оптическую плотность раствора при 278 нм (коэффициент молярной экстинкции $8,6 \cdot 10^4$, м. м. = 34 300). Полученный препарат фермента хранят в холодильнике.

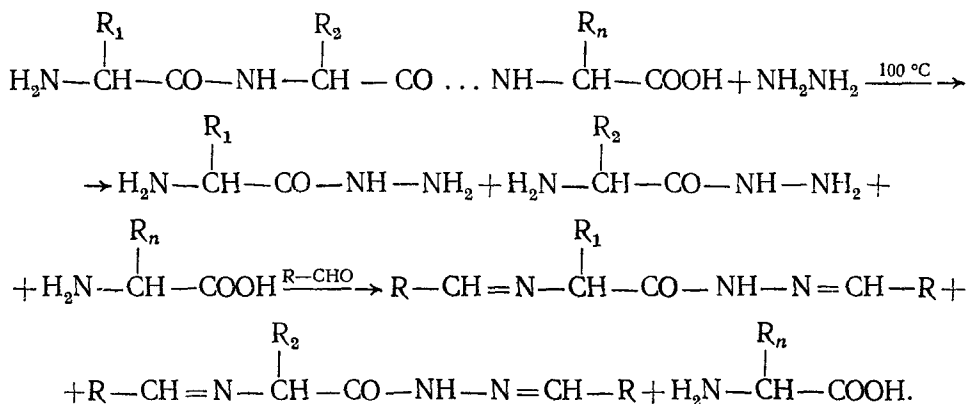
Определение. 0,5—1 мкмоль белка растворяют в 10—20 мл воды и осаждают на холоде, добавляя трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5%. Осадок промывают 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты, а затем 3—4 раза ацетоном для удаления ее следов. Указанные стадии позволяют удалить свободные аминокислоты, которые могут загрязнять препарат белка, и приводят к денатурации белка, повышающей доступность С-концевых аминокислот к действию карбоксипептидаз. При определении С-концевых аминокислот в пептидах первые стадии необходимо опустить. Промытый осадок белка или пептид растворяют в 0,2 М аммоний-бикарбонатном буфере или в

0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатом буфере до конечной концентрации 1—5 мг/мл и добавляют раствор карбоксипептидазы (отношение фермент : субстрат = 1 : 30—1 : 200). Проводят инкубацию при 37°C и отбирают аликвоты, содержащие 0,1—0,2 мкмоль белка, сразу после добавления фермента (нулевая точка), а затем через 30, 60, 120 и 420 мин после начала инкубации. Параллельно с опытной ставят контрольную пробу без белка, но содержащую все остальные компоненты реакционной смеси, включая карбоксипептидазу. Реакцию останавливают добавлением к отобраным пробам раствора уксусной кислоты до конечной концентрации 10%. Если при этом выпадает осадок, его отделяют центрифугированием и промывают 2 раза водой. Супернатант после первого центрифугирования и промывные жидкости объединяют и упаривают на ротаторном испарителе.

В полученных образцах определяют свободные аминокислоты. При тонкослойной хроматографии на пластинках «Фиксион» (с. 133) требуется не менее 10—30 нмоль аминокислот, для определения с помощью аминокислотного анализатора — 2—5 нмоль аминокислот. Можно предварительно провести реакцию дансирования (с. 148), а затем идентифицировать модифицированные аминокислоты с помощью тонкослойной хроматографии (в этом случае надо иметь 0,5—5 нмоль дансированных аминокислот). При количественном определении аминокислот можно исследовать зависимость освобождения их от времени инкубации образца с карбоксипептидазой.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ГИДРАЗИНОЛИЗА

При обработке белка или пептида безводным гидразином при нагревании (100°C) происходит гидролиз полипептидной цепи. При этом все аминокислоты, за исключением С-концевой, превращаются в гидразиды, а С-концевая аминокислота остается свободной:



Гидразиды аминокислот удаляют реакцией с бензальдегидом, изовалериановым и другими альдегидами, а находящуюся в водной фазе С-концевую аминокислоту анализируют методами хроматографии или электрофореза на бумаге и в тонком слое или с помощью аминокислотного анализатора. Смесь, получаемую после гидразинолиза, можно обрабатывать динитрофторбензолом или дансилхлоридом. Это дает возможность идентифицировать С-концевые аминокислоты в виде ДНФ- (с. 145) или ДНС-производных (с. 148).

Реактивы:

1. Исследуемые белки (рибонуклеаза, лизоцим и др.) или пептиды.
2. Гидразин (безводный). 50 г 80%-ного раствора гидразина смешивают с 500 мл толуола и 500 г СаО и выдерживают в течение 12 ч. Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч и отгоняют при 93—94°. Нижний слой дистиллята используют как безводный гидразин.

Внимание! Гидразин взрывоопасен! Работу с ним проводят в очках под вытяжкой, с малыми количествами.

3. Бензальдегид, свежеперегнанный.
4. Эфир серный.
5. Реактивы для определения аминокислот с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Фиксион» (с. 133).

Препарат белка или пептида в количестве 0,1—1 (обычно 0,25) мкмоль помещают в небольшую пробирку со шлифом и краном с отростком и высушивают в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 и концентрированной H_2SO_4 . К сухому образцу быстро добавляют 0,3 мл безводного гидразина. Пробирку закрывают пробкой с краном, вакуумируют с помощью масляного или водоструйного насоса и помещают в термостат на 8 ч при 105°C. По окончании гидролиза пробирку извлекают из термостата и содержимое освобождают от избытка гидразина упариванием в вакууме (на ротаторном испарителе). Сухой остаток выдерживают в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 и концентрированной H_2SO_4 в течение часа. Содержимое пробирки растворяют в 1 мл воды, добавляют 0,3 мл бензальдегида и встряхивают в течение часа. После центрифугирования нижний желтый слой бензальдегида, содержащий гидразиды аминокислот, отбирают пипеткой и отбрасывают, а верхний водный слой, содержащий С-концевую аминокислоту, экстрагируют 2 мл эфира и центрифугируют, верхний слой отбрасывают. Операцию повторяют дважды. Обработанный эфиром водный слой упаривают до 0,2—0,3 мл и используют для идентификации С-концевой аминокислоты любым из описанных выше способов (с. 145).

ЛИТЕРАТУРА

1. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот/Под ред. М. А. Прокофьева. М., 1985.
2. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976. С. 291.
3. Неорганическая биохимия./Под ред. Г. Эйхгорна. М., 1978. Т. 1. С. 504.
4. Бэйли Дж. Методы химии белков. М., 1965.
5. Croft L. R. Handbook of protein sequence analysis. Chichester, 1980. P. 117.
6. Schroeder W. Hydrazinolysis//Methods in Enzymology. 1972. Vol. 25B. P. 138.
7. Ambler R. P. Enzymatic Hydrolysis with Carboxypeptidases//Methods in Enzymology 1972 Vol. 25B. P. 143.

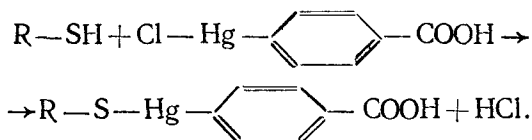
3. СУЛЬФИДРИЛЬНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Важная роль SH-групп белков в различных биохимических и физиологических процессах обусловлена их высокой реакционной способностью и многообразием химических превращений, в которые они вступают (ацилирование, окисление, алкилирование, образование меркаптидов, полумеркапталей, водородных связей и т. д.).

Для определения количества SH-групп в белках и пептидах наиболее широкое распространение получили следующие методы: амперометрическое титрование азотнокислым серебром, титрование *n*-хлормеркурибензоатом (*n*-ХМБ) (метод Бойера) и определение при помощи ДТНБ — реагента Элмана.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП МЕТОДОМ ТИТРОВАНИЯ *n*-ХЛОМЕРКУРИБЕНЗОАТОМ

Определение основано на том, что *n*-ХМБ образует со свободными сульфгидрильными группами меркаптидный комплекс:



Полученный меркаптид обладает специфическим поглощением при 250 нм, что позволяет определять количество сульфгидрильных групп в белках и пептидах.

Приготовление раствора *n*-ХМБ и определение его концентрации спектрофотометрическим методом

Спектрофотометрический метод определения концентрации *n*-ХМБ основан на специфическом поглощении его в ультрафиолетовой области спектра (232 нм). Коэффициент молярного поглощения *n*-ХМБ равен $1,69 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, м. м. — 379 Да.

Реактивы:

1. *n*-ХМБ натрия — $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ раствор.
2. KCl — 0,5 M раствор, подщелоченный до pH 7,6.
3. KOH — 2 н. раствор.
4. HCl — 0,5 н. раствор.

Навеску *n*-ХМБ количественно переносят в мерную колбу (на 25—50 мл) с 10—20 мл воды, подщелоченной 2 н. раствором KOH. Затем pH раствора доводят на потенциометре до 7,6, добавляя соляную кислоту, и доливают воду до метки. Соляную кислоту следует добавлять по каплям при энергичном перемешивании во избежание временного местного закисления раствора (замечают по помутнению раствора), при котором *n*-ХМБ выпадает в осадок. Приготовленный раствор хранят при комнатной температуре; как правило, он пригоден в течение нескольких дней. Время от времени необходимо проверять pH раствора, так как возможно его закисление за счет CO₂ воздуха и как следствие уменьшение концентрации раствора *n*-ХМБ. Если на дне склянки появляется осадок, раствор не пригоден для дальнейшего употребления.

Для определения концентрации полученного раствора *n*-ХМБ в две спектрофотометрические кюветы наливают по 2,8 мл раствора KCl.

В одну из кювет (вторая кювета контрольная) добавляют 0,05 мл раствора *n*-ХМБ, содержимое кюветы тщательно перемешивают пластмассовой палочкой и измеряют оптическую плотность при 232 нм. Затем еще три раза добавляя по 0,05 мл раствора *n*-ХМБ, измеряя каждый раз оптическую плотность при 232 нм.

По полученным данным рассчитывают концентрацию *n*-ХМБ $C_{n\text{-ХМБ}}$ по формуле:

$$C_{n\text{-ХМБ}} = \frac{A_{232} (2,8 + V)}{1,69 \cdot 10^4 \cdot V},$$

где *V* — объем добавленного раствора *n*-ХМБ.

Определение количества сульфгидрильных групп в глутатионе

Трипептид глутатион содержит в своем составе остаток цистеина.

Реактивы:

1. Глутатион восстановленный — $1 \cdot 10^{-3}$ М раствор.
2. Остальные реактивы те же, что на с. 158.

В кювету спектрофотометра наливают 0,1 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора глутатиона и 2,7 мл 0,5 М КСl (рН 7,6). В контрольную кювету — 2,8 мл 0,5 М КСl. В обе кюветы добавляют по 0,02 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М *n*-ХМБ, тщательно перемешивают и через 2 мин измеряют оптическую плотность при 250 нм (необходимость добавления раствора *n*-ХМБ в контрольную пробу вызвана сильным поглощением этого соединения при 250 нм). Затем последовательно еще 5—6 раз добавляют по 0,02 мл раствора, измеряя каждый раз (спустя несколько минут) его оптическую плотность. Объем последующих добавляемых порций *n*-ХМБ уменьшают до 0,01 мл. Добавление раствора продолжают до тех пор, пока не прекратится нарастание оптической плотности при внесении новых порций *n*-ХМБ. Это указывает на связывание всех SH-групп.

Построив кривую зависимости ΔA_{250} от объема добавленного *n*-ХМБ (рис. 24), определяют его количество, соответствующее точке перегиба на кривой. Так как в точке эквивалентности связан весь добавленный *n*-хлормеркурибензоат, его количество равно количеству сульфгидрильных групп в 0,1 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора глутатиона. Рассчитывают число SH-групп в пересчете на моль восстановленного глутатиона.

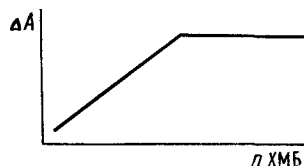


Рис. 24. Кривая титрования SH-групп глутатиона

Определение количества сульфгидрильных групп в препарате миозина

Сульфгидрильным группам миозина принадлежит важная роль в ферментативном катализе, а также в образовании актомиозинового комплекса. По данным аминокислотного анализа, в миозине содержится 15—17 моль SH-групп на каждые 200 000 г белка (молекулярную массу миозина в настоящее время считают равной 500 000 Да). В препаратах миозина методами титрования обычно определяется 10—12 моль SH-групп на 200 000 г белка (это количество несколько неоднозначно для разных препаратов миозина и зависит также от «возраста» белка: при хранении препаратов оно уменьшается).

Реактивы:

1. Миозин (получение см. на с. 392).
2. Реактивы для определения концентрации *n*-ХМБ (с. 158).

Для определения количества SH-групп исходный раствор миозина разводят 0,5 М КСl (рН 7,6) до конечной концентрации белка 0,85 мг/мл. В одну кювету спектрофотометра наливают 2,8 мл 0,5 М раствора КСl (контрольная проба), в другую — 2,8 мл разведенного раствора миозина. Измеряют оптическую плотность при 250 нм (обычно она составляет 0,4—0,6). Затем в обе кюветы добавляют по 0,02 мл

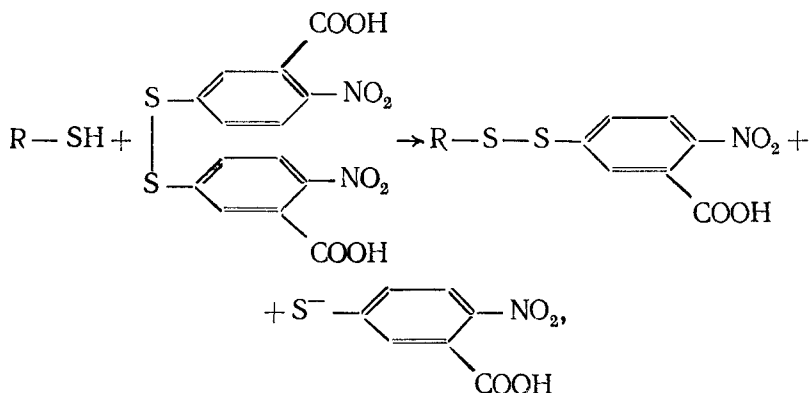
$5 \cdot 10^{-4}$ М раствора *n*-ХМБ (точная концентрация раствора определяется, как описано на с. 158), содержащее кювет тщательно перемешивают и через 2 мин измеряют оптическую плотность. Дальнейший ход титрования аналогичен описанному выше (с. 159) для раствора глутатиона.

Нужно иметь в виду, что в процессе титрования, когда связываются несколько менее реакционноспособные SH-группы миозина, образование меркаптидной связи замедляется. Поэтому после каждой добавленной порции *n*-ХМБ необходимо делать 3—4 измерения и при достижении плато перед добавлением следующей порции выждать 5—6 мин.

Построив кривую титрования (см. рис. 24) и определив точку эквивалентности, рассчитывают количество сульфгидрильных групп, соответствующее 200 000 г белка.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП С ПОМОЩЬЮ РЕАКТИВА ЭЛМАНА

В основе метода лежит реакция тиол-дисульфидного обмена:



в ходе которой освобождается анион 2-нитро-5-тиобензоата, обладающий поглощением при 412 нм. Коэффициент молярной экстинкции 2-нитро-5-тиобензоата зависит от pH. Обычно реакцию проводят при щелочных значениях pH (pH 8,0—9,0). При этом принимают $\epsilon_{412} = 14\,000$. Описываемый метод высокочувствителен и строго специфичен и может использоваться для определения количества сульфгидрильных групп в низкомолекулярных тиолах, нативных и денатурированных белках.

Реактивы:

1. Фосфатный (или трис-HCl) буфер — 10 мМ раствор, pH 8,0.
2. Исследуемый белок — 30—70 мкМ (по SH-группам) раствор в 10 мМ фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 1 мМ ЭДТА.
3. ДТНБ — 10 мМ раствор в 10 мМ фосфатном буфере, pH 8,0.

В кювету спектрофотометра вносят раствор белка и добавляют 5—10-кратный молярный избыток ДТНБ над сульфгидрильными группами. Полученную смесь перемешивают и через 5—10 мин измеряют оптическую плотность при 412 нм. Спустя 30 мин проводят повторное измерение оптической плотности, используя в качестве контроля раствор, содержащий равное количество ДТНБ, но не содержащий белка или низкомолекулярного тиола. Обычно реакция протекает очень быстро и максимальная оптическая плотность достигается через 5—

10 мин после начала реакции. Описанное определение количества сульфгидрильных групп можно проводить в присутствии денатурирующих белки агентов (6 М гуанидинхлорид или 8 М мочевины). В этих условиях происходит полная денатурация белка и удается определить суммарное количество сульфгидрильных групп, приходящихся на моль белка. Зная, что в ходе реакции модификация одной сульфгидрильной группы сопровождается освобождением одного аниона 2-нитро-5-тиобензоата, можно, определив оптическую плотность при 412 нм и зная коэффициент молярной экстинкции 2-нитро-5-тиобензоата, определить концентрацию сульфгидрильных групп в анализируемой инкубационной среде.

Если сульфгидрильные группы анализируемого белка высокореакционноспособны и легко подвергаются окислению, их определение можно проводить в присутствии восстановителей (дитиотреитола, меркаптоэтанола). В этом случае к раствору белка, содержащему восстановители, добавляют ДТНБ так, чтобы конечная концентрация реагента в 5—10 раз превышала суммарную концентрацию тиолов в инкубационной среде. После окончания реакции смесь подвергают гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50 или биогелем P-10 и отделяют белок от смеси низкомолекулярных соединений. К раствору белка, сульфгидрильные группы которого модифицированы ДТНБ, добавляют 3—5-кратный молярный избыток дитиотреитола. Концентрацию освобождающегося аниона 2-нитро-5-тиобензоата определяют по поглощению при 412 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М., 1977.
2. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980. С. 217.
3. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups//Arch. Biochem. Biophys. 1959. Vol. 82. P. 70.
4. Fuchs F. The effect of Ca^{2+} on the sulfhydryl reactivity of troponin: evidence for a Ca^{2+} -induced conformational change//Biochim. Biophys. Acta. 1971. Vol. 226. P. 453.

Б. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные биополимеры, обнаруженные во всех типах клеток. Структурными единицами нуклеиновых кислот являются моонуклеотиды, состоящие из гетероциклических азотистых оснований (пуриновых и пиримидиновых), пентоз и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты делятся на два типа: рибонуклеиновые (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК). РНК и ДНК различаются особенностями химического строения входящих в них пиримидиновых оснований и пентоз, локализацией в клетке и функциональным назначением в клеточном метаболизме.

1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Методы количественного определения нуклеиновых кислот основаны на определении содержания составляющих их компонентов: азотистых оснований (как правило, спектрофотометрически благодаря поглощению в ультрафиолетовой области спектра); пентоз (с помощью химических реакций, позволяющих отдельно определять рибозу и дезоксирибозу) и фосфора нуклеиновых кислот.

1. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Методы количественного определения нуклеиновых кислот, основанные на спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра, отличаются высокой чувствительностью и простотой проведения анализа. Необходимым этапом различных методов спектрофотометрического определения нуклеиновых кислот является их экстракция из биологического материала, сопряженная с гидролизом полинуклеотидов. В связи с этим следует иметь в виду, что из исследуемого материала предварительно необходимо удалить свободные нуклеотиды.

В основе модификации спектрофотометрического метода определения суммарного содержания нуклеиновых кислот, разработанной А. С. Спириным, лежит экстракция их из биологического материала горячей хлорной кислотой с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм. Автор предложил также формулу для расчета содержания нуклеиновых кислот.

Реактивы:

1. HClO_4 — 0,2 н. и 0,5 н. растворы.

Измельченную на холоде навеску ткани (100—200 мг) помещают в центрифужную пробирку с 5—10 мл охлажденного 0,2 н. раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием на холоде (3000 g, 10 мин). Центрифугат отбрасывают и осадок повторно отмывают хлорной кислотой. Такая предварительная обработка материала необходима для удаления кислоторастворимых нуклеотидов. После удаления центрифугата к осадку добавляют 5—10 мл 0,5 н. раствора HClO_4 и, закрыв пробирку пробками с воздушным холодильником, нагревают их в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Эта процедура обеспечивает количественную экстракцию нуклеиновых кислот из исследуемого материала и их кислотный гидролиз до растворимых фрагментов. Гидролизаты охлаждают и центрифугируют. Осадок подвергают повторной экстракции 0,5 н. HClO_4 . Гидролизаты объединяют и определяют поглощение на спектрофотометре при 270 и 290 нм против контрольного раствора — 0,5 н. раствора HClO_4 . При необходимости гидролизаты разводят тем же раствором.

Рассчитывают содержание фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл исследуемого раствора по формуле:

$$C_{\text{мкг Ф}_\text{н}} = \frac{A_{270} - A_{290}}{0,19},$$

где 0,19 — значение ΔA ($A_{270} - A_{290}$), которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора. При дальнейших расчетах учитывают общий объем гидролизата и разведения. Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот пользуются средним пересчетным коэффициентом 10,3:

$$C_{\text{мкг НК}} = C_{\text{мкг Ф}_\text{н}} \cdot 10,3.$$

Рекомендуется проводить дополнительное определение оптической плотности при 260 нм; оптическая плотность при 260 и 270 нм не должна различаться более чем на $\pm 15\%$.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ФОСФОРУ

Определение по фосфору считается наиболее надежным методом оценки количества нуклеиновых кислот, так как его процентное содержание в наименьшей степени зависит от нуклеотидного состава: для ДНК оно составляет 9,8—10,1%, для РНК — 9,1—9,6²⁶. При определении фосфора нуклеиновых кислот в тканях необходимо предварительно удалить свободные нуклеотиды, неорганический фосфат, а также все фосфорсодержащие соединения ненуклеотидной природы, в частности липиды.

Реактивы:

1. HClO_4 — концентрированная и 0,2 н. раствор.
2. Этиловый спирт 96% -ный.
3. Эфир.
4. Реактивы для определения общего фосфора (с. 34).

Измельченную на холоде навеску ткани (100—200 мг) помещают в центрифужную пробирку с 10 мл охлажденного 0,2 н. раствора хлорной кислоты, тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием на холоде (3000 g, 10 мин). Центрифугат отбрасывают, осадок отмывают повторно хлорной кислотой. Затем осадок промывают 5—10 мл охлажденного спирта для удаления кислоты и два раза смесью спирта с эфиром (1:1) при комнатной температуре для удаления липидов и пигментов. В заключение осадок обрабатывают эфиром и оставляют в вакуум-экспикаторе.

Для проведения минерализации высушенный материал переносят в колбу Кьельдаля или тугоплавкую пробирку и добавляют 0,3 мл смеси хлорной и серной кислот. Дальнейшие операции см. на с. 44.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ПЕНТОЗЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК С ДИФЕНИЛАМИНОМ ПО ДИШЕ

Метод основан на реакции между дифениламином и дезоксирибозой, отщепляющейся от пуриновых нуклеотидов в результате кислотного гидролиза. N-гликозидная связь в пиримидиновых нуклеотидах при этом не разрушается и вследствие этого определяется лишь около половины углевода, входящего в состав ДНК; поэтому рекомендуется в качестве стандарта использовать гидролизат ДНК, концентрацию которого предварительно определяют спектрофотометрическим методом.

Реактивы:

1. HClO_4 — 0,5 н. раствор.
2. Реактив Дише: 1 г дифениламина (перекристаллизованного из 70%-ного этилового спирта) растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты (х. ч.) и добавляют 2,75 мл концентрированной H_2SO_4 .
3. Стандартный раствор ДНК — 0,5 мг/мл. Навеску коммерческого препарата ДНК растворяют в 0,5 н. HClO_4 и нагревают 15 мин при 70°C; для определения точной концентрации гидролизат разводят в 50 раз 0,5 н. раствором HClO_4 и измеряют поглощение на спектрофотометре так, как это описано на с. 162.

²⁶ Исходя из содержания фосфата при спектрофотометрическом определении пересчетный коэффициент для ДНК составляет 10,1, для РНК — 10,5.

К 1—2 мл кислотного гидролизата ткани добавляют двойной объем реактива Дише. Смесь нагревают в течение 10 мин на водяной бане при 90°C и охлаждают. Одновременно проводят реакцию со стандартным раствором ДНК, содержащим от 50 до 500 мкг ДНК в пробе. При нагревании развивается устойчивая синяя окраска. Измеряют поглощение растворов на колориметре при 590 нм. Содержание ДНК в ткани рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору ДНК, с учетом всех разведений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РНК С ОРЦИНОМ ПО МЕЙБАУМ

Метод основан на реакции рибозы, входящей в состав РНК, с орцином. В результате гидролиза РНК в присутствии соляной кислоты образуется производное фурфурола, дающее при нагревании с орцином продукт зеленого цвета. Реакция не является высокоспецифичной: окрашенные продукты образуют дезоксирибоза, гексозы, полисахариды, а также некоторые другие соединения, однако чувствительность реакции орцина с рибозой намного выше.

Реактивы:

1. FeCl_3 — 0,1%-ный раствор, приготовленный на концентрированной HCl .
2. Орцин — 0,5%-ный раствор, готовят на растворе FeCl_3 (п. 1) перед употреблением.
3. Стандартный раствор РНК — 0,1 мг/мл. Навеску коммерческого препарата РНК растворяют в 0,5 н. HClO_4 , кипятят в течение 15 мин и измеряют поглощение на спектрофотометре (с. 162).
4. HClO_4 — 0,5 н. раствор.

К 2 мл исследуемого раствора, содержащего от 10 до 80 мкг РНК, приливают 2 мл раствора орцина, перемешивают и нагревают 20 мин на кипящей водяной бане. Пробы охлаждают и колориметрируют при 670 нм. Содержание РНК рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору РНК.

4. РАЗДЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РНК И ДНК В ТКАНЯХ (ПО МЕТОДУ ШМИДТА—ТАННГАУЗЕРА)

В основе метода лежит разделение РНК и ДНК путем гидролиза исследуемого материала слабой щелочью, при котором происходит расщепление РНК по 3',5'-фосфодиэфирным связям до мононуклеотидов. В этих условиях ДНК устойчива к действию щелочи, что делает возможным выделение ее в виде осадка.

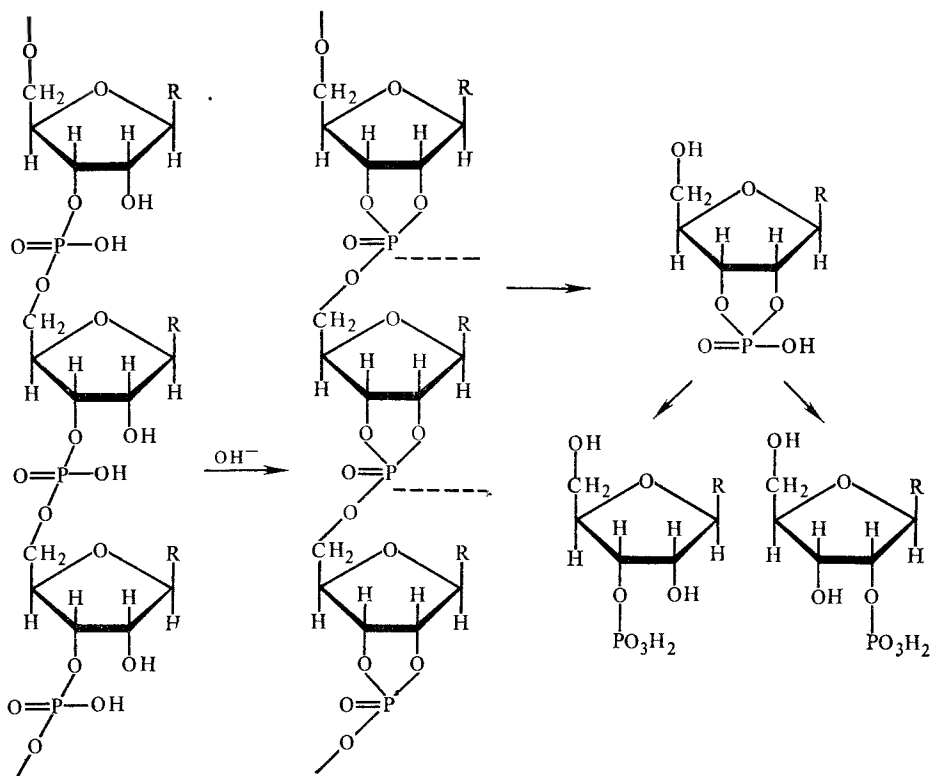
Определение РНК

Реактивы:

1. HClO_4 — концентрированная, 0,2 н. и 2%-ный растворы.
2. KOH — 0,75 н. и 40%-ный растворы.
3. Этиловый спирт.
4. Эфир.

Обработку ткани см. на с. 163. Все операции следует проводить быстро и на холоде, чтобы избежать энзиматической и кислотной деградации нуклеиновых кислот.

К высушенному материалу добавляют 0,5 н. раствор КОН (из расчета 1 мл щелочи на 100 мг сухого материала) и проводят гидролиз при 37°C в течение 18 ч (или 5 мин при кипячении). После гидро-



лиза суспензию охлаждают до 0°C и нейтрализуют по лакмусу хлорной кислотой. К нейтрализованной смеси добавляют концентрированную HClO_4 до конечной концентрации 1—2% и после интенсивного перемешивания смесь центрифугируют на холоде при 5000 g в течение 15 мин. После отделения супернатанта, содержащего рибомононуклеотиды, осадок дважды промывают 1 мл 2%-ного раствора HClO_4 . Центрифугаты объединяют, нейтрализуют 40%-ным раствором КОН по бромфеноловому синему и оставляют в холодильнике на 1—3 ч; выпавший осадок KClO_4 отделяют центрифугированием и отбрасывают, центрифугат используют для определения общего содержания рибонуклеиновых кислот спектрофотометрически (с. 162) или по цветной реакции на рибозу (с. 164), а также для определения нуклеотидного состава (с. 180).

Определение ДНК

Выделение препаратов ДНК с использованием метода Шмидта—Таннгаузера и освобождение их от белков могут быть проведены различными способами. В модификации, предложенной А. С. Орловым и Е. И. Орловой, щелочной гидролиз тканевых препаратов проводят без

предварительного выделения нуклеиновых кислот и удаления свободных нуклеотидов. ДНК отделяют от белков и осаждают спиртом.

Реактивы:

1. NaOH — 1 н. раствор.
2. NaCl — насыщенный раствор в 20%-ном растворе CH_3COOH .
3. HClO_4 — 0,5 н. раствор.
4. Этиловый спирт.

50—100 мг ткани помещают в центрифужную пробирку, добавляют 1 мл 1 н. раствора едкого натра и при помешивании нагревают в кипящей водяной бане в течение 5 мин (нагревание можно заменить инкубацией при 37°C в течение 18 ч). Прозрачный, слегка опалесцирующий гидролизат охлаждают до комнатной температуры и погружают в сосуд с тающим льдом. Добавляют 0,5 мл насыщенного раствора хлористого натрия, приготовленного на 20%-ном растворе уксусной кислоты. Через 3—5 мин выпавший в осадок белок отделяют центрифугированием (4°C , 600 g, 10 мин). Центрифугат сливают в стакан, осадок белка растворяют на холоде в 1 мл 1 н. раствора щелочи и белки вновь осаждают добавлением 0,5 мл NaCl. Раствор центрифугируют. Центрифугаты объединяют и для осаждения ДНК приливают в стакан с тройным объемом охлажденного этанола. Раствор оставляют на 1—2 ч в холодильнике и осадок ДНК собирают центрифугированием на холоде (600 g, 10 мин). К осадку добавляют 5 мл 0,5 н. раствора HClO_4 , закрывают пробками с воздушными холодильниками и помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. В гидролизате определяют содержание ДНК спектрофотометрически (с. 162) и по реакции с дифениламином (с. 163).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. М., 1976.
2. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот//Биохимия. 1958. Т. 23, № 4. С. 656.
3. Орлов А. С., Орлова Е. И. Простая методика количественного определения дезоксирибонуклеиновой кислоты в животных тканях//Биохимия 1961 Т. 26, № 5. С. 834

II. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ДНК ПО МЕТОДУ МАРМУРА

Данный метод является одной из модификаций метода Шмидта и Таннгаузера. Разделение РНК и ДНК в результате щелочного гидролиза осуществляется после предварительного выделения нуклеиновых кислот из биологического материала.

Реактивы:

1. Солевой раствор: 0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия, 0,01 М ЭДТА. Навеску ЭДТА растворяют в воде, доводят pH раствора до 8,0 и затем добавляют остальные компоненты.
2. Додецилсульфат натрия — 20%-ный раствор.
3. NaCl — 5 М раствор.
4. Хлороформ.

5. Изоамиловый спирт.
6. Этиловый спирт.
7. Эфир этиловый.
8. NaOH — 0,5 н. раствор.
9. HClO_4 — концентрированная и 2%-ный раствор.

Выделение нуклеиновых кислот. 20 г ткани²⁷ гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе или растирают в ступке с 5-кратным объемом солевого раствора. К гомогенату добавляют 20%-ный раствор ДСН до конечной концентрации 2% и выдерживают 30 мин в термостате при 37°C. К образовавшемуся вязкому раствору добавляют 5 М NaCl до концентрации 1 М для диссоциации нуклеопротеидного комплекса. Гомогенат переносят в колбу с притертой пробкой и тщательно встряхивают в течение 10—15 мин с 2,5 объемами смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1. Смесь переносят в стеклянные центрифужные стаканы на 50 мл, центрифугируют 30 мин при 800—1000 g. Надосадочная жидкость расслаивается на три фракции: в верхней содержатся нуклеиновые кислоты, в средней (плотной) — белки, в нижней, хлороформной фракции — липиды и другие компоненты.

Верхнюю фракцию осторожно отсасывают с помощью шприца в колбу. Повторяют обработку хлороформом и изоамиловым спиртом еще 2—3 раза, пока раствор нуклеиновых кислот не станет прозрачным. Полученный раствор отсасывают и медленно выливают в стакан с двойным объемом охлажденного 96%-ного этилового спирта, помешивая при этом спирт круговыми движениями. Выпадают белые спиралевидные образования — нуклеиновые кислоты. Для более полного осаждения раствор переливают из стакана в стакан. Спиралевидные нити осторожно переносят палочкой в стакан с небольшим количеством 70%-ного этилового спирта, повторяя операцию 2—3 раза с новыми порциями спирта. Затем нуклеиновые кислоты промывают сначала смесью спирт—эфир (1:1), затем эфиром и оставляют сушиться при комнатной температуре.

Разделение ДНК и РНК. Сухой препарат нуклеиновых кислот растворяют в 0,5 н. NaOH из расчета 2—3 мг/мл и выдерживают 15 мин в кипящей водяной бане. Раствор охлаждают и нейтрализуют на холоде, добавляя по каплям при помешивании концентрированную HClO_4 , затем доводят концентрацию HClO_4 до 2%. Выпавший осадок ДНК отделяют на центрифуге с охлаждением (3000 g, 10 мин). Осадок промывают дважды холодным раствором 2%-ной HClO_4 и дважды 70%-ным спиртом, затем смесью спирт—эфир и эфиром (осадок каждый раз собирают центрифугированием). Осадок ДНК высушивают на воздухе и анализируют.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДНК И РНК ФЕНОЛЬНЫМ МЕТОДОМ (ПО КИРБИ—ГЕОРГИЕВУ)

Метод предполагает получение высокополимерных ДНК и РНК, свободных от белков. Под действием водонасыщенного фенола на нуклеопротеиды осуществляется их депротеинизация, причем при различных значениях pH для дезокси- и рибонуклеопротеидов. Обработка фенолом инактивирует нуклеазы, что позволяет получать нуклеиновые кислоты в нативном состоянии.

²⁷ Здесь и в других задачах при выделении ДНК из печени животное рекомендуется не кормить в течение суток.

1. Фенол — перегнанный, водонасыщенный, рН 6,0 и 8,3. Фенол перегоняют на песчаной или масляной бане. В колбу Вюрца помещают 88 г фенола, 12 мл H_2O , 100 мг алюминиевых стружек и 50 мг NaHCO_3 . Собирают фракцию, кипящую при 183°C . При хранении в холодильнике фенол длительное время не подвергается окислению. Перегнанный фенол помещают в делительную воронку, приливают равный объем воды, тщательно встряхивают и оставляют на несколько часов. После расслоения жидкостей слой фенола осторожно сливают в сухую склянку. Фенол нейтрализуют NaOH .
2. NaCl — 0,14 М раствор, содержащий 0,05 М цитрат калия.
3. Спирт этиловый абсолютный.
4. Эфир, содержащий 6—7 капель ледяной уксусной кислоты на 100 мл.

Все операции следует проводить на холоде. Около 20 г ткани (печень, мозг, селезенка, см. сноску на с. 167), взятой после декапитации (с. 221), измельчают ножницами и гомогенизируют (или растирают) в 10-кратном объеме 0,14 М NaCl (п. 2). Полученный гомогенат фильтруют через 1—2 слоя марли. К фильтрату добавляют равный объем фенола рН 6,0. Смесь интенсивно встряхивают в колбе с притертой пробкой или делительной воронке в течение 40 мин и центрифугируют на холоде (600 g, 30 мин). Содержимое пробирки (стакана) разделяется на 3 слоя. Верхний (водный), содержащий депротеинизированную РНК, осторожно отсасывают при помощи шприца в чистую колбу и сохраняют. Средний слой, непрозрачный, вязкий, содержащий дезоксирибонуклеопротеиды и нерастворимые в феноле белки, подвергают вторичной обработке фенолом. Третий — прозрачный фенольный слой, содержащий растворимые в феноле белки, отбрасывают.

При повторной обработке к среднему слою добавляют 5-кратный (по отношению к навеске ткани) объем фенола и хлористого натрия. Смесь интенсивно встряхивают и центрифугируют. Верхний водный слой осторожно отсасывают и соединяют с первым. Промежуточный отсасывают и используют для получения ДНК. Фенольный слой отбрасывают.

Выделение РНК. К водному раствору, содержащему РНК, добавляют для дополнительной депротеинизации фенол рН 6,0 (1/2 объема), интенсивно встряхивают 20 мин и центрифугируют на холоде (600 g, 30 мин). Верхний слой отсасывают и для осаждения РНК приливают в стакан с тройным объемом хорошо охлажденного этанола и оставляют в холодильнике на 1 ч (не рекомендуется в этой стадии оставлять на более длительное время, так как возможна денатурация РНК). Выпавший осадок РНК собирают центрифугированием на холоде (3000 g, 10 мин) и затем растворяют в небольшом количестве воды. Нерастворившийся осадок удаляют центрифугированием и отбрасывают. Препарат разливают на порции и хранят в замороженном состоянии или в холодильнике с добавлением нескольких капель толуола. Полученный препарат РНК содержит высоко- и низкополимерную фракции.

Выделение ДНК. К промежуточному слою, полученному после повторной обработки фенолом (рН 6,0), добавляют водонасыщенный фенол (рН 8,3) в количестве, равном первоначально взятому (из расче-

та 10 мл на 1 г навески ткани), встряхивают несколько минут, добавляют равный объем воды и перемешивают 30—40 мин не очень интенсивно (круговыми движениями). При этом происходит депротеинизация и ДНК переходит в водную фазу. На этой стадии препарат может быть оставлен на ночь в холодильнике. Затем смесь центрифугируют на холоде (600 g, 30 мин). В центрифугате образуются три слоя. Верхний, водный слой, содержащий ДНК, осторожно отсасывают с помощью шприца; промежуточный и фенольный слои встряхивают повторно со 100 мл NaCl, центрифугируют и водный слой объединяют с полученным ранее.

ДНК из объединенного водного раствора выделяют осаждением этанолом (2—2,5 объема, до исчезновения опалесценции раствора). ДНК выпадает в виде нитей. Для дальнейшей очистки ДНК переосаждают спиртом из 0,14 М NaCl. Для этого нити ДНК наматывают на палочку, подсушивают фильтровальной бумагой и переносят в раствор NaCl. После растворения ДНК вновь осаждают 2—2,5 объемами этанола, выдерживают в холодильнике в течение 1 ч и центрифугируют на холоде. Осадок промывают спиртом, эфиром и высушивают в вакуум-экспикаторе. ДНК можно хранить непродолжительное время в солевом растворе (с добавлением нескольких капель толуола).

Определение чистоты выделенных препаратов РНК и ДНК проводят спектрофотометрически, по содержанию фосфора и пентоз (с. 162).

3. ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА РНК ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ ФЕНОЛЬНЫМ МЕТОДОМ (ПО ШЕРРЕРУ)

При обработке гомогенатов печени водонасыщенным фенолом РНК переходит в водную фазу. Выход повышается в присутствии додецилсульфата натрия, который является также ингибитором рибонуклеаз. Для предотвращения экстракции ДНК обработку фенолом рекомендуется проводить при рН 6,0 и 60°C.

Реактивы:

1. Натрий-ацетатный буфер — 0,01 М раствор, содержащий 0,5%-ный ДСН, рН 5,1.
2. Фенол — перегнанный, водонасыщенный, рН 6,0 (приготовление см. на с. 168).
3. Спирт этиловый.
4. HClO_4 — 1 н. раствор.

Крысу декапитируют, быстро извлекают печень (см. сноску к с. 167) и отмывают ее от крови охлажденным буфером. Ткань измельчают (с. 49), взвешивают и гомогенизируют на холоде с 8-кратным объемом ацетатного буфера. К вязкой суспензии добавляют равный объем фенола, закрывают колбу притертой пробкой и встряхивают в бане при 60°C в течение 5 мин. После этого колбу помещают в сосуд со льдом. Холодную смесь переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют при 600 g на холоде в течение 30 мин. Смесь разделяется на три слоя: водный, промежуточный и фенольный. Водный слой отсасывают с помощью шприца в чистую колбу, а промежуточный и фенольный слои отбрасывают. К водному слою добавляют равный объем фенола и повторяют встряхивание. После центрифугирования водный

слой отсасывают, добавляют к нему тройной объем этанола для осаждения РНК и оставляют при 0°C на ночь.

Осадок РНК отделяют центрифугированием на холоде (3000 g, 10 мин). Осадок растворяют в небольшом объеме ацетатного буфера и снова осаждают РНК тройным объемом охлажденного спирта. Оставляют на ночь при 0°C или на 2 ч при —10°C. Выпавший осадок отделяют центрифугированием и растворяют в небольшом объеме ацетатного буфера. Хранят в замороженном состоянии или в холодильнике с добавлением толуола.

В полученном растворе определяют содержание РНК: 0,1—0,2 мл раствора РНК доводят водой до 1,5 мл, добавляют равный объем 1 н. раствора HClO_4 и гидролизуют в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Содержание РНК определяют спектрофотометрически и по реакции с орцином (с. 162, 164).

4. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ РИБОСОМ

Рибосомы получают из гомогената печени крысы (см. сноску к с. 167) методом дифференциального ультрацентрифугирования. Обломки клеток, ядра и митохондрии удаляют центрифугированием при 18 000 g; рибосомы осаждают ультрацентрифугированием при 105 000 g.

Экстракцию РНК из рибосом проводят методом фенольной депротеинизации. Процедуру выделения рекомендуется проводить в присутствии ингибиторов РНКаз, поскольку высокополимерные рибосомные РНК могут подвергаться расщеплению нуклеазами.

Реактивы:

1. Трис- HCl буфер — 0,1 М раствор, pH 7,6.
2. MgCl_2 — 0,1 М раствор.
3. Сахароза.
4. KCl х. ч.
5. Фенол — перегнанный, водонасыщенный, pH 6,5 (приготовление см. на с. 168).
6. Хлороформ.
7. Эфир.
8. Спирт этиловый.
9. Гепарин.
10. Натрий-ацетатный буфер — 0,1 М раствор, pH 5,0

Получение рибосом из печени крысы. Навеску ткани гомогенизируют (приготовление препарата см. на с. 49) в гомогенизаторе Поттера в 5-кратном объеме среды выделения следующего состава: 0,01 М трис-буфер (pH 7,6), 0,02 М MgCl_2 и 0,05 М сахароза. Гомогенат центрифугируют на холоде при 18 000 g в течение 30 мин. Центрифугат сливают в колбу, осадок суспендируют в таком же объеме среды выделения и повторяют гомогенизацию. Гомогенат центрифугируют, осадок отбрасывают, а центрифугат объединяют с первым. Объединенный раствор подвергают ультрацентрифугированию при 105 000 g в течение 90 мин. Осадок рибосом суспендируют в среде, содержащей 0,1 М трис-буфер и 0,001 М MgCl_2 . Если суспензия мутная, ее осветляют центрифугированием на холоде (18 000 g, 15 мин). Очистка фракции рибосом может быть проведена также ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы 10—30% (с. 172).

Экстракция РНК. К суспензии рибосом добавляют ингибитор РНКаз гепарин (можно использовать также диэтилпиروкарбонат, поливинилсульфат) из расчета 0,5 мг на 1 мл и равный объем фенола. Смесь встряхивают 30 мин и центрифугируют на холоде 30 мин при 600—1000 g. При помощи шприца отбирают верхний водный слой и добавляют к нему снова фенол (1/2 объема). После интенсивного встряхивания и центрифугирования водный слой переносят в делительную воронку и добавляют равный объем смеси хлороформа с эфиром 1:1. После встряхивания и отстаивания собирают водный слой и осаждают из него РНК, приливая в тройной объем охлажденного этилового спирта. Раствор оставляют на несколько часов при —20°C. Осадок рибосомной РНК собирают центрифугированием на холоде (3000 g, 20 мин), растворяют в небольшом объеме ацетатного буфера и повторяют осаждение спиртом. Осадок рибосомной РНК после центрифугирования высушивают или хранят в этаноле при —20°C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Химия и биохимия нуклеиновых кислот/Под ред. И. Б. Збарского, С. С. Дебова. Л., 1968.
2. Георгиев Г. И. Быстрый метод получения дезоксирибонуклеиновых кислот в высокополимерном состоянии//Биохимия. 1959 Т. 24. № 3. С. 472.
3. Magrum J. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms//J. Mol. Biol. 1961. Vol. 3, N 2. P. 208.
4. Kirby K. S. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid//Biochem. J. 1965. Vol. 96. P. 266.

III. МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

При разделении нуклеиновых кислот используют те же методы, что и при фракционировании белков, однако имеются ограничения, обусловленные большим диапазоном величин молекулярной массы ($2 \cdot 10^4$ — $1 \cdot 10^{10}$ Да), отклонениями от глобулярной формы, различиями в четвертичной структуре (двухнитевые, однонитевые, кольцевые), значительным отрицательным зарядом в нейтральной области рН. Поэтому методы гель-фильтрации и ионообменной хроматографии не получили широкого распространения при фракционировании нуклеиновых кислот и значительно уступают ультрацентрифугированию и электрофоретическому разделению в геле агарозы, полиакриламидном геле или их смеси. Поскольку величина отрицательного заряда нуклеиновых кислот и продуктов их расщепления мало зависит от рН, а отношение заряда к молекулярной массе сохраняется практически неизменным, разделение нуклеиновых кислот при электрофорезе определяется не их зарядом, а размером молекул. При наличии маркеров с известной молекулярной массой возможно определение молекулярной массы препаратов нуклеиновых кислот и их фрагментов.

1. АДсорбционная хроматография нуклеиновых кислот на гидроксипатите

Разделение различных фракций РНК, ДНК и их гибридов основано на различии в прочности сорбции одно- и двухнитевых молекул нуклеиновых кислот; прочность сорбции фрагментов нуклеиновых кислот повышается с увеличением их длины. Десорбция вызывается увеличением концентрации фосфатного буфера.

Реактивы:

1. Суспензия гидроксилapatита (коммерческий препарат или синтезированный в лаборатории по методике, описанной на с. 114).
2. Калий-фосфатный буфер — 0,4 М и 0,03 М растворы, pH 7,2.
3. Препарат ДНК, РНК (или их смеси), полученный одним из описанных выше способов.

Колонку (2×15 см) заполняют густой суспензией гидроксилapatита так, как это описано на с. 102. Колонку промывают 100 мл 0,03 М фосфатного буфера. Затем в нее вносят препарат нуклеиновой кислоты из расчета 0,2 мг на 1 мл суспензии (сухие препараты растворяют в 0,03 М калий-фосфатном буфере, менее очищенные препараты предварительно освобождают от избытка ионов). Устанавливают скорость тока жидкости 0,2 мл/мин·см². Колонку промывают 50—100 мл исходного буфера и проводят элюцию в линейном градиенте концентрации фосфатного буфера 0,03—0,4 М. Общий объем элюента — 400 мл. Собирают фракции по 5—10 мл. Содержание нуклеиновых кислот определяют по поглощению при 260 нм. Порядок элюции нуклеиновых кислот с колонки гидроксилapatита при постепенном увеличении концентрации фосфатного буфера следующий: РНК, одонитевая ДНК, двухнитевая нативная ДНК.

2. УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ САХАРОЗЫ

Фракционирование белков, нуклеиновых кислот и других макромолекул при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы основано на различии в скорости седиментации молекул, пропорциональной их молекулярной массе. Фракции РНК, обладающие различной молекулярной массой, после центрифугирования распределяются в линейном градиенте концентрации сахарозы; при этом благодаря значительной вязкости растворов сахарозы улучшается разделение и уменьшается возможность смешивания различных фракций.

Реактивы:

1. Натрий-ацетатный буфер — 0,1 М раствор, pH 5,1, содержит 0,05 М NaCl, 0,001 М ЭДТА и 0,01 % -ный ДСН.
2. Сахароза — 20 и 5 % -ные растворы, готовят на первом реактиве.

Линейный градиент сахарозы 5—20 % создают с помощью специального прибора-смесителя, аналогичного изображенному на рис. 14, А. Готовят одновременно 3 или 6 пробирок по 5 мл и оставляют в холодильнике. Образцы РНК растворяют в Na-ацетатном буфере в концентрации 1—2 мг/мл. Очень медленно и осторожно наслаивают по 0,1—0,2 мл каждого образца на поверхность градиента сахарозы. Пробирки осторожно переносят в бакет-ротатор SW-50 или SW-65 Ti. Ультрацентрифугирование проводят в течение 15—16 ч при 23 000 g или 6 ч при 140 000 g. После центрифугирования пробирки извлекают из ротора и раскапывают их на фракции по 3—5 капель, либо прокалывая их снизу иглой от шприца, либо опуская на дно пробирки тонкий капилляр, который присоединяют к перистальтическому насосу. Фракции собирают при помощи коллектора. К каждой фракции добавляют 2—3 мл буфера и определяют поглощение на спектрофотометре. Строят график зависимости оптической плотности от номера фракции.

3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Методы электрофоретического разделения в полиакриламидном и агарозополиакриламидном гелях широко используются в настоящее время для фракционирования нуклеиновых кислот. Преимуществом этих методов является их простота и возможность контролировать величину пор геля. При наличии маркёров с известной молекулярной массой или коэффициентом седиментации они могут быть использованы для характеристики относительной молекулярной массы выделенных препаратов нуклеиновых кислот.

РАЗДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ ФРАКЦИИ РНК

Реактивы:

1. Трис-ацетатный буфер — 0,12 М раствор, рН 7,8 (0,12 моль трис, 0,06 моль ацетата натрия, 0,003 моль ЭДТА растворяют в прокипяченной воде, добавляют концентрированной CH_3COOH до рН 7,8 и доводят объем до 1 л).
2. Акриламид.
- Внимание! Работу с акриламидом проводить в перчатках и под тягой!**
3. Метиленбисакриламид.
4. Персульфат аммония — 0,5%-ный раствор, свежеприготовленный.
5. Бромфеноловый синий — 0,1%-ный раствор.
6. ТЕМЕД.
7. CH_3COOH — 7%-ный раствор.
8. Метиленовый синий — 0,2%-ный раствор в 0,4 М натрий-ацетатном буфере.
9. Сахароза — 40%-ный раствор.

Приготовление геля. Фракционирование РНК проводят в 2,2%-ном полиакриламидном геле (поскольку полиакриламидный гель данной концентрации имеет полужидкую консистенцию, рекомендуется сначала сделать «пробку» из геля более высокой концентрации или 1%-ной агарозы; трубки можно закрыть снизу целлофановой пленкой). К смеси 2,2 г акриламида и 0,12 г метиленбисакриламида добавляют 33 мл трис-ацетатного буфера рН 7,8, 50 мл прокипяченной H_2O , 0,075 мл ТЕМЕД, 16 мл 0,5%-ного раствора персульфата аммония. Смесь осторожно перемешивают и заливают для полимеризации в кассету или трубочки электрофоретической камеры (с. 94). Сверху наслаивают трис-ацетатный буфер, разведенный в 3 раза (электродный буфер).

Проведение электрофореза. После окончания полимеризации буфер с поверхности геля отсасывают и наносят образцы РНК, полученные одним из описанных выше методов, в объеме 0,01—0,05 мл. Раствор РНК разводят электродным буфером до концентрации 2 мг/мл и добавляют равный объем 40%-ного раствора сахарозы. В электродные камеры заливают трис-ацетатный буфер (рН 7,8), разведенный в 3 раза. Для предотвращения денатурационных изменений РНК разделение рекомендуется проводить при 4°C.

Электрофоретическое разделение проводят в течение 60—90 мин при напряженности электрического поля 4—5 В/см или силе тока 5 мА на трубку. В качестве лидирующего красителя используют рас-

твор бромфенолового синего. После окончания электрофореза гели вынимают, фиксируют в течение 30 мин в 7%-ном растворе уксусной кислоты и окрашивают 0,2%-ным раствором метиленового синего в течение 4 ч. Избыток красителя отмывают 7%-ной CH_3COOH . Полученные электрофореграммы сканируют и определяют процентное содержание каждой фракции. Если в том же опыте изучается электрофоретическая подвижность РНК-маркёров (рибосомальная РНК печени крысы, РНК из *Escherichia coli* и др.), можно определить коэффициент седиментации и относительную молекулярную массу отдельных фракций РНК.

РАЗДЕЛЕНИЕ РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК

Реактивы:

1. Трис-ацетатный буфер — 0,4 М раствор, pH 7,6: 0,2 моль трис, 0,1 моль ацетата натрия и 0,01 моль ЭДТА растворяют в прокипяченной воде, добавляют концентрированной CH_3COOH до pH 7,6 и доводят водой до 500 мл.
2. Агароза — 1%-ный раствор.
3. Акриламид — 15%-ный раствор, содержащий 0,75% метиленисакриламида.

Внимание! Работу с акриламидом проводить в перчатках и под тягой!

4. ТЕМЕД.
5. Персульфат аммония — 10%-ный раствор.
6. Электродный буфер — раствор № 1 разводят в 10 раз.
7. Бромфеноловый синий — 0,1%-ный раствор.
8. CH_3COOH — 7%-ный раствор.
9. Метиленовый синий — 0,2%-ный раствор в 0,4 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,7.

Приготовление агарозополиакриламидного геля. Смешивают 4 мл раствора № 1, 7,0 мл раствора № 3, 5 мл прокипяченной H_2O и 0,04 мл ТЕМЕД. Расплавляют на кипящей водяной бане 20 мл 1%-ного раствора агарозы (следят, чтобы в растворе не осталось пузырьков воздуха), охлаждают до 50°C и добавляют 4 мл 1%-ного раствора персульфата аммония. Оба раствора быстро смешивают и заливают в предварительно прогретые трубки (или кассету) электрофоретической камеры (с. 95). Полимеризация протекает при комнатной температуре в течение часа.

Проведение электрофореза. Поверхность гелей промывают охлажденным электродным буфером и наносят по 10—50 мкг РНК в 0,02—0,05 мл электродного буфера, содержащего 10%-ную сахарозу и 0,02%-ный бромфеноловый синий. Для предотвращения денатурационных изменений рибосомной РНК электрофорез проводят при 4°C. Электрофоретическое разделение проводят в течение 3,5—4 ч (4—5 В/см для пластин геля или 5 мА на трубку).

Обработку электрофореграмм см. выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы исследования нуклеиновых кислот/Под ред. А. Н. Белозерского. М., 1970.
2. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981.
3. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М., 1982.
4. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985.

IV. ФЕРМЕНТАТИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Расщепление нуклеиновых кислот под влиянием специфических ферментов — эндо- и экзонуклеаз — сопровождается разрывом фосфодиэфирной связи и образованием продуктов различной величины, которые могут быть разделены методами электрофореза и хроматографии. Это широко используется при анализе последовательности нуклеотидов в молекулах РНК и ДНК. Особое значение при развитии генной инженерии получило расщепление ДНК специфическими эндонуклеазами (рестриктазами), позволяющее получать отрезки ДНК определенной длины и нуклеотидного состава.

1. ПОЛУЧЕНИЕ РЕСТРИКТОВ ДНК ФАГА λ И РАЗДЕЛЕНИЕ ИХ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В ГЕЛЕ АГАРОЗЫ

При полном расщеплении ДНК фага λ рестриктазой Hind III образуются фрагменты, содержащие 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 и 165 пар оснований; они могут быть разделены с помощью электрофореза в геле агарозы.

Реактивы:

1. Трис-HCl буфер — 0,01 М раствор, pH 7,5, содержащий 0,01 $MgCl_2$ и 0,01 М β -меркаптоэтанол.
2. Глицерин — 50%-ный раствор, содержащий 0,05 М ЭДТА, 0,25%-ный бромфеноловый синий и 0,25%-ный ксиленианол.
3. Агароза (используют препараты с низкой величиной электроосмоса).
4. Электродный буфер — 0,04 М трис-HCl буфер, pH 7,5, содержащий 0,02 М ацетат натрия и 0,002 М ЭДТА.
5. Бромистый этидий — 3 мг в 1 мл H_2O .

Внимание! Бромистый этидий ядовит, поэтому все операции следует проводить в резиновых перчатках!

Получение рестриктов ДНК фага λ . 2 мкг ДНК фага λ растворяют в 20 мкл раствора № 1, добавляют рестриктазу Hind III (2—4 ед. ферментативной активности) и инкубируют в течение 60 мин при 37°C. Затем смесь прогревают при 70°C в течение 10 мин и охлаждают во льду. К образцу добавляют 5 мкл глицерина (раствор № 2) и подвергают электрофоретическому разделению в 1%-ном геле агарозы.

Приготовление геля. Взвешивают агарозу (250 мг) и добавляют к ней 25 мл электродного буфера. Суспензию нагревают на кипящей водяной бане до получения прозрачного раствора, не содержащего пузырьков воздуха. Охлаждают агарозу до 40°C и осторожно заливают в предварительно прогретую кассету прибора для электрофореза (с. 97). Оставляют при комнатной температуре на 1—2 ч для полимеризации.

Проведение электрофореза. Наносят в лунки геля смесь рестриктов ДНК фага λ и анализируемый образец ДНК (0,05—5 мкг в зависимости от гомогенности образца). Электрофорез проводят в течение 3—4 ч при напряженности электрического поля 4—5 В/см (можно уменьшить напряжение до 1—2 В/см и проводить электрофорез в течение 10—12 ч). За движением образца следят по перемещению бром-

После окончания электрофореза гель окрашивают в растворе бромистого этидия в течение 20—40 мин в темноте. Гель промывают водой и просматривают в ультрамикроскопе. Зоны, содержащие ДНК, выявляются в виде красновато-оранжевых полос на темном фоне.

Интенсивность окраски бромистым этидием зависит от размеров рестриктов: зоны крупных рестриктов удается выявить при наличии 30—50 нг в полосе. Для выявления мелких рестриктов необходимо иметь 200—500 нг фрагмента ДНК в каждой полосе. Поэтому для обнаружения всех фрагментов, образующихся при обработке ДНК фага λ рестриктазой Hind III, необходимо наносить на гель образцы с минимальным (0,3—0,5 мкг) и максимальным (2—5 мкг) количеством ДНК. В последнем случае удается выявить все зоны рестриктов, при этом полосы крупных рестриктов выявляются в виде сильно перегруженных зон, а полосы средних и мелких по размеру рестриктов — в виде тонких, четко разделенных полос.

Измерив подвижность всех рестриктов ДНК, строят график зависимости относительной подвижности от логарифма молекулярной массы.

2. РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗОЙ И РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

РНКаза поджелудочной железы гидролизует фосфодиэфирные связи внутри молекулы одноцепочечной высокополимерной РНК. В результате образуется смесь олиго-, ди- и мононуклеотидов, которые могут быть отделены от фермента и субстрата — высокополимерной РНК — гель-хроматографией на колонке. Разделение рибонуклеотидов, различающихся по числу нуклеотидных звеньев, может быть проведено методом ионообменной хроматографии.

ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКЕ С СЕФАДЕКСОМ

Реактивы:

1. Натрий-ацетатный буфер — 0,1 М раствор, pH 5,0.
2. Раствор РНК — 0,5%-ный, готовят на растворе № 1.
3. РНКаза из поджелудочной железы быка (0,15—0,25 Е/мл) — 0,5—2 мкг/мл ацетатного буфера.
За единицу активности принимают количество фермента, вызывающее уменьшение оптической плотности ΔA_{300} на 1 ед. при инкубации с 0,05%-ным раствором РНК при pH 5,0 и $t^\circ = 25^\circ \text{C}$ в течение 1 мин.
4. NaCl — 0,05 М раствор.
5. Сефадекс G-25 или G-50.

Колонку размером 1×20 см заполняют набухшим гелем (с. 106) и уравнивают 0,05 М NaCl. К 1 мл раствора РНК добавляют 1 мл раствора РНказы и оставляют на 2 ч при 37°C. После инкубации смесь охлаждают и тотчас наносят на колонку. Элюцию проводят 0,05 М NaCl. Собирают фракции по 3 мл и определяют в них оптическую плотность при 260 нм. Рекомендуется также измерять поглощение при 300 нм, так как в данной области спектра находится максимум поглощения полимерной РНК. Строят график зависимости оптической плотности от номера фракции или объема элюента.

Олигонуклеотиды несут большой отрицательный заряд, поэтому они с успехом могут быть разделены на слабых крупнопористых анионообменниках. Для этой цели используют колонки, заполненные ДЭАЭ-сефадексом, ДЭАЭ-целлюлозой, Эктеола-целлюлозой и др. Нуклеотиды элюируются с колонки в градиенте концентрации NaCl в порядке увеличения их молекулярной массы. Для подавления неспецифической сорбции нуклеотидов на полисахаридных матрицах хроматографии проводят в присутствии 7 М мочевины.

Реактивы:

1. NaCl — 2 М раствор.
2. Трис-HCl буфер — 0,005 М, pH 7,8.
3. NaCl — 0,02 М, готовят на растворе № 2.
4. NaCl — 0,02 М, готовят на растворе № 2 и добавляют мочевины до 7 М (стартовый буфер).
5. NaCl — 0,3 М раствор, готовят на растворе № 2 и добавляют мочевины до 7 М.
6. ДЭАЭ-целлюлоза.

Колонку размером 1×20 см наполняют ДЭАЭ-целлюлозой. Подготовку ионообменника и заполнение колонки см. на с. 109. Сорбент промывают 2 М NaCl до тех пор, пока поглощение элюата при 260 нм не станет менее 0,02. Затем колонку промывают 5—10 объемами 0,005 М трис-буфера, pH 7,8.

Гидролизат РНК (с. 176) или фракцию рибонуклеотидов, полученную в результате гель-фильтрации (с. 176), разбавляют так, чтобы концентрация солей в нем была менее 0,02 М, доводят pH до 7,8 и осторожно наносят на колонку. Устанавливают скорость тока жидкости 0,2—0,5 мл/мин на 1 см² поверхности геля. Колонку трижды промывают 2 мл 0,02 М забуференного раствора NaCl, не содержащего мочевины. Затем вносят 5 мл стартового буфера и присоединяют колонку к системе для градиентной элюции (см. с. 104). В сосуд 2 наливают 250 мл стартового буфера, в сосуд 1 — 250 мл 0,3 М NaCl. Собирают фракции по 5 мл и определяют в них оптическую плотность при 260 нм. Строят профиль элюции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шапот В. С. и др. Методы выделения и определения активности нуклеаз//Современные методы в биохимии/Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1964. Т. 1. С. 267.
2. Методы исследования нуклеиновых кислот/Под ред. А. Н. Белозерского. М., 1970.
3. Маньятис М. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
4. Murray K., Murray N. E. Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriction endonucleases III of Haemophilus influenzae and restriction endonuclease I from *Escherichia coli*//J. Mol. Biol. 1975. Vol. 98. P. 551.
5. Methods in Enzymol. Part 1 (L. Grossman, K. Moldave, eds). N. Y., 1980. Vol. 65.

V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ ДНК

Нуклеотидный состав ДНК может быть определен в результате расщепления высокополимерной молекулы соответствующими ДНКаз-

ми до мононуклеотидов. Кислотный гидролиз приводит к расщеплению ДНК до свободных азотистых оснований. Последние могут быть идентифицированы методами хроматографии и электрофореза.

Кислотный гидролиз ДНК

Реактивы:

1. HClO_4 — 70% - или 57% - ный раствор.
2. HCl — концентрированная.
3. KOH — 4 М и 1 М растворы.
4. Спирт этиловый.

Препараты ДНК, полученные из различных тканей животных, дважды промывают этанолом и высушивают в вакуум-эксикаторе. Высушенные осадки смачивают 1—2 каплями концентрированной HClO_4 и гидролизуют в запаянных ампулах в кипящей водяной бане в течение 1 ч²⁸. Препараты ДНК, полученные по методу Мармура, берут для гидролиза в количестве 5—10 мг. После вскрытия ампул гидролизаты переносят капилляром в центрифужные пробирки, добавляют к ним 2 капли 4 М KOH и осторожно, по каплям — 1 М KOH до нейтральной реакции. После этого добавляют капилляром 1 каплю концентрированной HCl и центрифугируют 10 мин при 3000 g. Объем надосадочной жидкости доводят водой до 1 мл и подвергают хроматографическому анализу.

РАЗДЕЛЕНИЕ ОСНОВАНИЙ ДНК МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Реактивы:

1. Бумага хроматографическая — ватман № 1, FN 14—17, ленинградская²⁹.
2. HCl — 0,1 н. раствор.
3. Щелочной растворитель — *n*-бутанол— H_2O —концентрированный NH_4OH в соотношении 60:10:0,1.
4. Кислый растворитель — изопропанол — концентрированная HCl — вода в соотношении 34:9:70.
5. Стандартные растворы оснований ДНК — аденина, гуанина, тимина, цитозина, 5-метилцитозина — 0,005 М в H_2O или 0,05 н. NaOH .

Разделение оснований ДНК проводят методом нисходящей хроматографии (с. 126). Растворитель заливают в камеру и оставляют на ночь для насыщения. На линию старта наносят по 0,05—0,1 мл гидролизата ДНК. На эту же хроматограмму наносят растворы оснований-«свидетелей» в количестве 0,05—0,07 мкмоль. Процесс разделения длится от 20 до 40 ч. Локализацию азотистых оснований проводят в ультрафемископе. Расположение оснований в порядке удаления от

²⁸ При использовании 57%-ного раствора HClO_4 к осадку приливают 0,05—0,1 мл кислоты и время гидролиза увеличивают до 2 ч.

²⁹ Для удаления примесей, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра, хроматографическую бумагу типа «ленинградская» следует промыть 2 н. раствором уксусной кислоты и затем отмыть дистиллированной водой до нейтральной реакции.

свободных гуанин, цитозин, тиминидин, аденин, тимин. Для количественного определения оснований в гидролизатах соответствующие участки хроматограмм элюируют 4 мл 0,1 н. HCl при 37°C в течение ночи и спектрофотометрируют против элюатов, полученных из контрольных участков хроматограммы. Оптическую плотность измеряют при длине волны, характерной для максимума поглощения данного основания (с 499), а для учета неспецифического поглощения — при 290 нм. Определив ΔA для каждого нуклеотида и пользуясь коэффициентом молярного поглощения, вычисляют содержание каждого нуклеотида в пятне. Определяют его процентное содержание по отношению к общему количеству нуклеотидов.

РАЗДЕЛЕНИЕ ОСНОВАНИЙ ДНК МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография на целлюлозе «Фильтрак»

Реактивы:

1. Целлюлоза «Фильтрак» (ГДР).
2. NaOH — 0,5 н. раствор.
3. HCl — 0,5 н. раствор.
4. Реактивы для хроматографического разделения оснований ДНК на бумаге (с. 178).

Приготовление пластинок. 20 г целлюлозы суспендируют в 150—200 мл H₂O до получения густой равномерной суспензии и наносят пипеткой с широким отверстием по 30 мл на стеклянные пластинки размером 24×10 см, предварительно тщательно вымытые и протертые эфиром. При нанесении суспензии пластинки должны располагаться строго горизонтально для получения ровного слоя носителя. Пластины высушивают на воздухе в течение суток.

Проведение хроматографического разделения. На пластинки на расстоянии 4 см от нижнего края и 1,5 см друг от друга наносят капилляром растворы «свидетелей» (по 0,05—0,07 мкмоль) и гидролизат ДНК (по 20—50 мкл). Все растворы следует наносить маленькими порциями и подсушивать теплым воздухом. Пластинку помещают в камеру, насыщенную растворителем. Хроматографическое разделение длится 4—6 ч. Пластинку высушивают на воздухе и определяют локализацию азотистых оснований в ультрамикроскопе. Если разделение произошло недостаточно четко, хроматографический процесс повторяют. Для количественного определения оснований пятна на пластинках обводят простым карандашом и целлюлозу осторожно соскабливают скальпелем или бритвой в пробирки. Приливают в них по 2—3 мл 0,5 н. HCl и проводят элюцию в течение 10—15 ч при 37°C, периодически встряхивая. Осадок отделяют и в растворе определяют концентрацию азотистых оснований спектрофотометрически, пользуясь таблицей на с. 499.

Поскольку гуанин плохо растворим в щелочном растворителе, для его количественного определения рекомендуется проводить разделение в кислой системе. Стандартный раствор гуанина готовят при подкислении.

Хроматография на пластинках «Силуфол»

На пластинках «Силуфол UV-254» простым карандашом отмечают точки на расстоянии 2,5 см от нижнего края и 1,5 см друг от друга.

В них наносят капиллярами или автоматическими микропипетками 1—2 мкл гидролизата ДНК и растворов оснований-«свидетелей» (5—10 нмоль). Пятна подсушивают теплым воздухом. Пластинки помещают в хроматографические камеры, насыщенные растворителем. Используют те же растворители, что и при хроматографии на целлюлозе «Фильтрак». Когда растворитель поднимется на 4/5 высоты пластинки, ее вынимают, высушивают под тягой и просматривают в ультрамикроскопе. Пятна оснований четко локализованы благодаря флуоресцирующему носителю.

2. НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ РНК

Для определения нуклеотидного состава РНК подвергают гидролитическому расщеплению. При кипячении с минеральными кислотами РНК, как и ДНК, расщепляется на составляющие компоненты — азотистые основания, рибозу и фосфор. В 0,5—1 н. растворе щелочи РНК гидролизуются до нуклеотидов, в то время как ДНК щелочному гидролизу не подвергается и примесь ее может быть отделена в виде осадка.

Щелочной гидролиз РНК

Реактивы:

1. NaOH — 0,75 н. раствор.
2. Катионообменная смола Дауэкс-50, Амберлит IRC-50 или КРС-8п в H⁺-форме. Подготовку смолы см. на с. 109.

К 100—200 мг РНК добавляют 0,75 н. NaOH из расчета 1 мл щелочи на 100 мг препарата и проводят гидролиз при 37°C в течение 18 ч. После гидролиза суспензию охлаждают и для удаления ионов Na⁺ точно наносят на колонку (0,5×3 см), заполненную катионообменной смолой в H⁺-форме. Элюат собирают, колонку промывают трижды 3 мл воды. Фракции объединяют и упаривают на ротаторном испарителе. Осадок растворяют в минимальном объеме воды и фракционируют рибомононуклеотиды методами электрофореза или хроматографии.

РАЗДЕЛЕНИЕ РИБОМОНОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ

Для разделения рибомононуклеотидов используют низковольтный (градиент напряжения 15—20 В/см), средневольтный ($\Delta U = 30—40$ В/см) или высоковольтный ($\Delta U = 50—80$ В/см) электрофорез на бумаге.

Реактивы:

1. Ацетатно-аммонийный буфер — 1,4 М раствор, рН 3,5. Для приготовления буфера 2 М CH₃COOH титруют концентрированным NH₄OH до рН 3,3 и доводят водой до концентрации 1,4 М по ацетату; буфер может храниться длительное время.
2. HCl — 0,01 н. раствор.
3. Растворы рибомононуклеотидов-«свидетелей» (адениловой, гуаниловой, уридиловой и цитидиловой кислот) — 0,01 М.

4. Хроматографическая бумага — ленинградская (промытая, см. с. 178), ватман № 1, ватман 3 ММ, FN 14—17.

Низковольтный электрофорез. Описание камеры для низковольтного электрофореза приведено на с. 89. В кюветы наливают 0,07 М ацетатно-аммонийный буфер, который получают разведением раствора № 1; рН полученного раствора проверяют на потенциометре: он не должен превышать 3,4—3,5.

На полоски хроматографической бумаги шириной 4—5 см на линию старта наносят щелочной гидролизат РНК (10—20 мкл) и растворы нуклеотидов-«свидетелей» по 0,1—0,15 мкмоль каждого. Электрофорез проводят в течение 5 ч при силе тока 0,5 мА на 1 см поперечного сечения бумаги. Для определения времени окончания электрофоретического разделения можно использовать окрашенный маркер, например 1%-ный раствор ксиленианола, который движется быстрее самого подвижного компонента смеси. Локализацию рибомононуклеотидов проводят в ультрамикроскопе. Подвижность нуклеотидов от катода к аноду возрастает в ряду: цитидиловая, адениловая, гуаниловая и уридиловая кислоты. Для количественного определения участки электрофореграмм, поглощающие в ультрафиолетовой области, очерчивают простым карандашом, вырезают, измельчают и элюируют нуклеотиды 4—5 мл 0,01 н. раствора HCl в течение 4—5 ч. В элюатах определяют поглощение на спектрофотометре при длине волны, характерной для каждого нуклеотида (см. Приложение, с. 499), рассчитывают количество их в микромолях и в процентах по отношению к сумме всех нуклеотидов в щелочном гидролизате РНК.

Средневольтный электрофорез (описание прибора см. на с. 138). В качестве электродного буфера используют ацетатно-аммонийный буфер 0,15 М, который получают разведением реактива № 1 (рН не должен превышать 3,4—3,5). Электрофоретическое разделение проводят в течение 3 ч при градиенте напряжения 30 В/см.

РАЗДЕЛЕНИЕ РИБОМОНОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Реактивы:

1. Ацетатно-аммонийный буфер — 1 М, рН 3,7. Для приготовления буфера 2 М раствор CH_3COOH титруют концентрированным NH_4OH до рН 3,7 и доводят водой до концентрации 1 М по ацетату.
2. Этиловый спирт.
3. *n*-Бутиловый спирт.
4. Аммиак концентрированный.
5. Изомасляная кислота.
6. Стандартные растворы рибомононуклеотидов-«свидетелей» — 0,01 М растворы.
7. Хроматографическая бумага — ленинградская, промытая (с. 178), FN 14—17.

Разделение проводят методом нисходящей хроматографии (с. 126) путем последовательного пропускания двух различных растворителей. Состав первого растворителя: этиловый спирт — *n*-бутанол — ацетатно-аммонийный буфер в соотношении 4:1:2. Состав второго растворителя: изомасляная кислота — аммиак — вода в соотношении 50:1:27 (рН 3,5—4,0).

На листы хроматографической бумаги соответствующего размера наносят растворы нуклеотидов-«свидетелей» (адениловой, гуаниловой, цитидиловой и уридиловой кислот) и анализируемой смеси рибомононуклеотидов после щелочного гидролиза РНК в количестве, соответствующем 0,05—0,1 мкмоль каждого нуклеотида. Хроматограмму помещают в камеру, насыщенную первым растворителем, и пропускают его около суток (на вытекание). Затем хроматограмму вынимают, высушивают и помещают в камеру со вторым растворителем, который также пропускают ~24 ч.

При последовательном пропускании двух растворителей достигается хорошее разделение рибомононуклеотидов. R_f увеличивается в ряду: адениловая, цитидиловая, уридиловая и гуаниловая кислоты. Обнаружение и количественное определение нуклеотидов проводят так же, как после электрофоретического разделения (с. 181).

РАЗДЕЛЕНИЕ РИБОМОНОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Для разделения рибомононуклеотидов используют ионообменную тонкослойную хроматографию. Для этой цели можно использовать готовые пластинки с катионообменником «Фиксион 50×8» в H^+ -форме (с. 133) или с анионообменниками на основе целлюлозы: с ДЭАЭ-, Эктеола- и ПЭИ-целлюлозой. При наличии анионообменника пластинки могут быть изготовлены в лаборатории.

Реактивы:

1. CH_3COOH — 1 н. раствор.
2. $LiCl$ — 0,3 М раствор.
3. Растворы рибомононуклеотидов-«свидетелей» — 0,005 М.
4. Полиэтилениминцеллюлоза.

Приготовление пластинок с ПЭИ-целлюлозой. Порошок ПЭИ-целлюлозы (10—20 г) промывают 50%-ным этиловым спиртом и проводят обработку сорбента по методике, описанной на с. 109. Для приготовления пластинок можно использовать как чистую ПЭИ-целлюлозу, так и смесь ее с микрокристаллической целлюлозой «Филтрак» в весовом соотношении 1:4. Для приготовления пластинки размером 10×20 см необходимо 2—4 г целлюлозы (30—35 мл суспензии).

Стеклянные пластинки тщательно моют детергентом, прополаскивают, протирают эфиром и кладут на строго горизонтальную поверхность. Целлюлозу суспендируют в 15—20 мл воды и гомогенизируют в гомогенизаторе Поттера для того, чтобы суспензия была равномерной и не содержала комков. Пипеткой с широким отверстием равномерно распределяют суспензию по пластинке и оставляют сушиться при комнатной температуре на 10—12 ч.

Хроматографическое разделение. На пластинку с ПЭИ-целлюлозой на расстоянии 1,5—2 см от нижнего края и между точками наносят гидролизат РНК и мононуклеотиды-«свидетели» в количестве 100—150 нмоль каждого (на тонкие пластинки промышленного изготовления 15—30 нмоль). Восходящую хроматографию проводят сначала в 1 М растворе уксусной кислоты. Когда растворитель поднимется на 4—5 см, пластинку вынимают и, не высушивая, помещают в 0,3 М раствор хлористого лития. Разделение продолжают до тех пор, пока фронт растворителя не поднимется на $4/5$ высоты пластинки. Хрома-

тограмму вынимают, высушивают и просматривают в ультрамикроскопе. В описанной системе относительная подвижность возрастает в ряду: гуаниловая, уридилловая, адениловая и цитидилловая кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. В а н ю ш и н Б. Ф. Определение нуклеотидного состава нуклеиновых кислот//Современные методы в биохимии/Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1964. Т. 1. С. 236.
2. Методы исследования нуклеиновых кислот/Под ред. А. Н. Белозерского. М., 1970.
3. О с т е р м а н Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985.
4. К и р х н е р Ю. Тонкослойная хроматография. М., 1981. Т. 2.

В. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДЕНИНСОДЕРЖАЩИХ НУКЛЕОТИДОВ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

Нуклеотиды не только являются структурными элементами нуклеиновых кислот, но и содержатся в клетках в свободном виде. Известно большое число ферментативных реакций, для которых необходимы компоненты адениловой системы в качестве субстратов, доноров энергии и регуляторов.

Адениловые нуклеотиды переходят в раствор при обработке тканей хлорной или трихлоруксусной кислотой. Белки при этом денатурируют. В безбелковом экстракте компоненты адениловой системы разделяют хроматографическими и электрофоретическими методами.

Получение безбелкового экстракта тканей

Реактивы:

1. HClO_4 или CCl_3COOH — 4%-ные растворы.

Только что извлеченные из организма мышцы (сердце, печень, мозг) помещают в хорошо охлажденную ступку и заливают жидким азотом. Сильно промерзшую ткань тщательно растирают, подливая жидкий азот, и быстро делают навески по 0,3—0,4 г (с. 29). Навески помещают в пробирки, стоящие во льду, приливают двойной объем охлажденного раствора кислоты и ткань тщательно размешивают в течение 5—10 мин. Белок удаляют центрифугированием (10 мин, 3000 g); надосадочную жидкость используют для электрофоретического или хроматографического анализа. Перед проведением хроматографического разделения необходимо освободиться от трихлоруксусной кислоты экстракцией эфиром, а от хлорной кислоты — осаждением КОН (с. 29, 33). При необходимости надосадочную жидкость концентрируют лиофилизацией.

Адениловые нуклеотиды из безбелкового центрифугата можно выделить также в виде ртутных солей (см. п. 2 в «Литературе», с. 189).

1. РАЗДЕЛЕНИЕ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

МЕТОД ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ

Реактивы:

1. Цитратный буфер — 0,05 M, pH 5,1.

2. Стандартные растворы АТФ, АДФ, АМФ — 0,01 М растворы
3. Бумага хроматографическая — ленинградская (промытая, см. с. 178), FN 14—17, ватман 3 ММ.

Разделение проводят в камере для низковольтного электрофореза (с. 89). Кюветы заполняют цитратным буфером. Вырезают полосы хроматографической бумаги шириной 4—5 см и наносят на них тканевой экстракт и стандартные растворы нуклеотидов-«свидетелей» в количестве, соответствующем 0,1—0,15 мкмоль каждого нуклеотида. Разделение проводят в течение 4—5 ч при градиенте напряжения 15—20 В/см и силе тока 0,5 мА на 1 см поперечного сечения бумажной полосы. Местоположение нуклеотидов идентифицируют в ультрахемископе.

МЕТОД ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Реактивы:

1. Цитрат натрия (3-замещенный) — 2,5%-ный раствор, рН 8,5
2. Спирт изоамиловый.
3. Стандартные растворы АТФ, АДФ и АМФ — 0,01 М растворы.
4. Бумага хроматографическая ленинградская (промытая, см. с. 178), FN 14—17.

Приготовление растворителя. Равные объемы изоамилового спирта и 2,5%-ного раствора цитрата натрия сливают в делительную воронку и встряхивают в течение 10 мин для взаимного насыщения. После расщелачивания отделяют раствор цитрата и изоамилового спирта. Оба раствора помещают в хроматографическую камеру (высота слоя цитрата — 1 см, изоамилового спирта — 0,5 см) и оставляют на сутки для насыщения камеры парами растворителя.

Разделение. На листе хроматографической бумаги проводят простым карандашом линию старта (на расстоянии 4 см от нижнего края листа), на которую наносят исследуемые растворы (суммарное количество адениловых нуклеотидов — 0,3—0,4 мкмоль). На ту же хроматограмму наносят растворы нуклеотидов-«свидетелей» по 0,05—0,1 мкмоль каждого. Интервал между точками на линии старта должен быть не менее 4—5 см. Растворы наносят небольшими порциями и подсушивают в токе холодного воздуха. При восходящей хроматографии (рис 17) лист хроматографической бумаги сшивают, следя, чтобы края не соприкасались, помещают в камеру и укрепляют в вертикальном положении. После того как растворитель поднимется на 3/4 высоты бумаги, хроматограмму вынимают, высушивают и просматривают в ультрахемископе. Если разделение недостаточно четкое, хроматографирование повторяют.

МЕТОД ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография на пластинках «Силуфол»

Реактивы:

1. NH_4OH — концентрированный.
2. Изопропиловый спирт
3. Пластинки «Силуфол UV-254».

На пластинку на расстоянии 1,5—2 см от нижнего края наносят с интервалом в 1—1,5 см исследуемый раствор и растворы нуклеотидов-«свидетелей» по 2—4 нмоль каждого нуклеотида. Растворы наносят капиллярами и подсушивают в токе холодного воздуха. Пластинку помещают в сосуд с плоским дном, куда слоем в 1 см наливают растворитель: изопропанол — вода — аммиак (7:2:1,5)³⁰. Когда фронт растворителя поднимется до верхнего края пластинки, ее вынимают, высушивают под тягой и положение нуклеотидов на хроматограмме определяют с помощью ультрахемискапа.

Хроматография на пластинках «Фиксион»

Реактивы:

1. HCl — 1 н раствор
2. Пластинки «Фиксион 50×8».

Перед разделением пластинки «Фиксион» переводят в H⁺-форму. Для этого их промывают в течение 16 ч 1 н. раствором HCl, а затем бидистиллированной водой. Способ промывки описан на с. 134. На высушенные промытые пластинки на расстоянии 2 см от нижнего края наносят исследуемые растворы и нуклеотиды-«свидетели» с интервалом 1,5—2 см между точками. Наносимые образцы должны содержать не менее 0,03 мкмоль каждого нуклеотида. Затем пластинку помещают в хроматографическую камеру в раствор 1 н. HCl. Когда растворитель поднимется на 3/4 высоты пластинки, ее вынимают, высушивают и пятна нуклеотидов локализуют с помощью ультрахемискапа

Хроматография на пластинках с модифицированной целлюлозой

Для разделения нуклеотидов используют слабо- и среднеосновные анионообменники на основе целлюлозы. ДЭАЭ-, Эктеола- и ПЭИ-целлюлозу. Могут быть использованы как коммерческие пластинки, так и приготовленные в лаборатории. Подготовка сорбента и приготовление пластинок с тонким слоем ПЭИ-целлюлозы описаны на с. 182. В отличие от хроматографии рибомононуклеотидов хорошего разделения компонентов адениловой системы можно добиться, применяя в качестве растворителя 0,5 М раствор хлористого лития

Здесь дается описание метода тонкослойной хроматографии на Эктеола-целлюлозе.

Реактивы.

1. Эктеола-целлюлоза.
2. HCl — 0,01 и 0,05 н. растворы.

Приготовление пластинок. Эктеола-целлюлозу (5 г) растирают в агатовой ступке с 15 мл воды до кашицеобразной массы и добавляют около 15 мл воды до получения легко растекающейся суспензии. В центр чистой стеклянной пластинки (9×12 см) наносят 5 мл взвеси, быстрыми покачиваниями стекла распределяют суспензию равномерно по поверхности пластинки и помещают пластинку для подсыхания на горизонтальный столик, выверенный по уровню.

³⁰ Другие рекомендуемые растворители диоксан — концентрированный NH₄OH — вода (6 1 4), бутанол — CH₃COOH — вода (5 2 3)

Нанесение образца и разделение нуклеотидов. На расстоянии 1,5—2 см от края пластинки проводят стартовую линию, на которую с интервалами в 2 см наносят исследуемый раствор (0,01—0,02 мл) и стандартные растворы нуклеотидов, содержащие не менее 0,1 мкмоль каждого нуклеотида. Пластинку помещают в сосуд с плоским дном, в который налит 0,05 н. раствор соляной кислоты. Через 5—10 мин, когда растворитель поднимется на 2/3 высоты пластинки, ее вынимают, высушивают в токе теплого воздуха и идентифицируют положение нуклеотидов по поглощению в ультрафиолетовой области спектра

Для количественного определения участки, содержащие нуклеотиды, аккуратно обводят простым карандашом, соскабливают целлюлозу в пробирку, заливают 5 мл 0,01 н. раствора HCl и оставляют на сутки. Осадок отделяют центрифугированием и в центрифугате проводят измерение поглощения при 260 и 290 нм. По разности поглощения рассчитывают содержание нуклеотидов в пробах.

МЕТОД ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА КОЛОНКЕ

Реактивы:

1. Анионит типа Дауэкс-1 или Дауэкс-2.
2. HCl — 0,003 н., 0,01 н. и 1 н. растворы.
3. NaCl — 0,02 М и 0,2 М растворы, приготовленные на 0,01 н. растворе HCl.
4. NH₄OH — 1 н. раствор.
5. NH₄Cl — 0,01 М раствор.

Подготовка анионита и заполнение колонки. 2 г анионита суспендируют в 50 мл воды и дают отстояться. Жидкость с осадка декантируют. Для переведения смолы в Cl-форму осадок заливают 20—30 мл 1 н. раствора HCl, перемешивают и оставляют на 30 мин. Затем промывают водой до нейтральной реакции. Промытую смолу взмучивают в небольшом количестве воды и заполняют колонку так, как описано на с. 110. Перед нанесением пробы колонка должна быть уравновешена 1 н. раствором NH₄OH, с которого будет начата хроматография. Для этого пропускают 6—8 объемов (около 100 мл) 1 н. раствора аммиака.

Разделение нуклеотидов. Наносят на колонку опытный раствор, содержащий 10—12 мкмоль нуклеотидов в 1—2 мл 1 н. раствора NH₄OH. Колонку промывают водой до нейтральной реакции. Элюцию нуклеотидов осуществляют с помощью ступенчатого градиента. Для этого последовательно пропускают через колонку следующие растворы: 0,01 М раствор NH₄Cl (150—200 мл), 0,003 н. раствор HCl — для элюции АМФ (около 300 мл). Как только рН элюата достигает 3,0, начинают собирать при помощи коллектора фракции по 3 мл и анализируют их при 260 нм. Элюцию продолжают до тех пор, пока экстинкция не снизится до 0,05. Далее пропускают 0,02 М раствор NaCl в 0,01 н. HCl — для элюции АДФ (около 200 мл), после этого 0,2 М раствор NaCl в 0,01 н. HCl — для элюции АТФ (около 200 мл). Фракции собирают и анализируют при 260 нм.

Для характеристики и количественного определения нуклеотидов фракции, соответствующие отдельным пикам на кривой эволюции, объединяют и анализируют. Концентрирование фракций осуществляют лиофилизацией

После окончания хроматографического разделения смолу регенерируют промыванием 2 н. раствором HCl с последующим отмыванием водой до нейтральной реакции.

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ АДЕНИЛОВОЙ СИСТЕМЫ

Спектрофотометрическое определение по аденину. Определение основано на том, что аденин и его производные имеют максимум поглощения при ~ 260 нм, коэффициент молярного поглощения при pH 2,0 (см. Приложение, с. 499).

Участки хроматограммы или электрофореграммы, поглощающие в ультрафиолетовой области спектра, вырезают, измельчают и элюируют 0,01 н. раствором HCl в течение 4 ч. В элюате определяют оптическую плотность при 260 нм. Для учета содержания примесей, имеющих поглощение в той же области спектра, определяют оптическую плотность при 290 нм и по разности ($A_{260} - A_{290}$) рассчитывают содержание адениловых нуклеотидов (с. 499).

Определение по фосфору. Исследуемый раствор нуклеотидов или элюаты из участков бумаги или сорбента, содержащие АТФ, АДФ и АМФ, помещают в колбочки для сжигания. В качестве контроля используют растворы или элюаты из участков бумаги, не содержащие адениловых нуклеотидов. Проводят минерализацию проб и определяют неорганический фосфат по методу Фiske—Суббароу (с. 34).

Определение по пентозе проводят так, как описано ранее (с. 164).

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

Динуклеотиды НАД^+ , НАДН , НАДФ^+ и НАДФН выполняют функции коферментов в окислительно-восстановительных реакциях. Раздельное определение окисленной и восстановленной форм никотинамидных коферментов основано на различной устойчивости их в разбавленных растворах кислот и щелочей. НАД^+ и НАДФ^+ относительно устойчивы в кислой среде и легко разрушаются в щелочной, особенно при нагревании; НАДН и НАДФН , напротив, устойчивы в щелочной среде и быстро разрушаются в растворах кислот.

Реактивы:

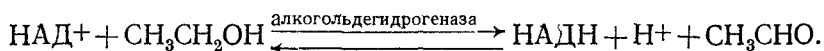
1. HClO_4 — 0,5 н. раствор.
2. KOH — 40%-ный раствор.
3. Na_2CO_3 — 0,1 М раствор.
4. Цистеин — 0,02 М раствор, готовится непосредственно перед использованием.
5. Яблочная кислота — 1 М раствор.
6. Калий-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, pH 7,8.
7. Семикарбазид- HCl — 0,1 М раствор, pH 7,8.
8. Этиловый спирт.
9. Алкогольдегидрогеназа — 1 мг/мл.
10. Феназинметасульфат — 1 мг/мл.
11. Глицил-глициновый буфер — 0,1 М раствор, pH 7,5.
12. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,033 М раствор.
13. Глюкозо-6-фосфат — 0,025 М раствор.
14. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

Только что извлеченную из организма ткань (печень, мышцы, сердце) помещают в ступку с жидким азотом, замораживают и измельчают в порошок. Взвешивание ткани следует проводить очень быстро, чтобы не произошло ее размораживания.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАД⁺ И НАДФ⁺

Для извлечения окисленных нуклеотидов навеску замороженной измельченной ткани (1 г) помещают в 4-кратный объем охлажденной 0,5 н. HClO₄ и растирают на холоде в ступке с кварцевым песком в течение 5—10 мин для лучшей экстракции. Осадок ткани удаляют центрифугированием при 12 000 g, надосадочную жидкость сливают в охлажденные мерные центрифужные пробирки и нейтрализуют 40%-ным раствором КОН до pH 7,0. Осадок перхлората калия удаляют центрифугированием. В нейтральном экстракте определяют содержание НАД⁺ и НАДФ⁺.

Определение НАД⁺. Метод основан на специфической реакции восстановления НАД⁺ алкогольдегидрогеназой в присутствии этанола:



Реакцию сдвигают вправо добавлением к реакционной смеси семикарбазида, который необратимо реагирует с ацетальдегидом. О количестве НАДН судят по нарастанию поглощения при 340 нм (с. 7).

В кювету спектрофотометра помещают 1,0 мл нейтрализованного экстракта ткани, 1,0 мл 0,05 М фосфатного буфера, 0,3 мл 0,1 М раствора семикарбазида, 0,1 мл этилового спирта и воду до 2,95 мл. Снижают исходные показатели оптической плотности опытной пробы против контрольной (не содержащей экстракта). Реакцию начинают добавлением 0,05 мл алкогольдегидрогеназы. Регистрацию нарастания оптической плотности прекращают, когда два последних отсчета, сделанные с интервалом в 5 мин, совпадают.

Определение НАДФ⁺. Метод основан на специфическом восстановлении НАДФ⁺ в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (с. 40). Количество НАДФ⁺ определяют по изменению оптической плотности при 340 нм.

В спектрофотометрическую кювету помещают 1,0 мл нейтрализованного экстракта ткани, 0,5 мл 0,1 М глицил-глицинового буфера, 0,1 мл 0,033 М раствора MgCl₂, 0,1 мл 0,025 М раствора глюкозо-6-фосфата и H₂O до 2,95 мл. Реакцию начинают добавлением 0,05 мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и регистрируют нарастание оптической плотности до полного прекращения ее изменений.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАДН И НАДФН

Восстановленные никотинамидные коферменты экстрагируют из ткани 4-кратным объемом 0,1 М раствора Na₂CO₃. Для предотвращения окисления восстановленных нуклеотидов к раствору соды непосредственно перед помещением пробирок в водяную баню добавляют раствор цистеина (0,1 мл на 3,9 мл раствора соды). Пробирки³¹ нагревают в кипящей водяной бане в течение 3 мин, после чего в них

³¹ Щелочную экстракцию ткани удобно проводить в коротких широких пробирках, заканчивающихся воронкообразным расширением. Это помогает исключить потери, возможные при внесении навески ткани в нагретый раствор соды.

быстро помещают 1 г замороженной и измельченной в порошок ткани, хорошо перемешивают стеклянной палочкой и продолжают нагревание еще 2 мин. Затем пробы охлаждают во льду и полученный экстракт нейтрализуют 1 М раствором яблочной кислоты до pH 7,0. Осадок ткани отделяют центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин и промывают нейтрализованным до pH 7,0 раствором 0,05 М Na₂CO₃. Промывные воды объединяют с первым центрифугатом, измеряют объем и оставляют на сутки при +4°C. Установлено, что за 24 ч в щелочных экстрактах происходит спонтанное окисление восстановленных нуклеотидов. Критерием полноты окисления НАДН и НАДФН служит отсутствие изменения оптической плотности при 340 нм после добавления в кювету с 2,4 мл глицилглицинового буфера 0,5 мл щелочного экстракта и 0,1 мл феназинметасульфата.

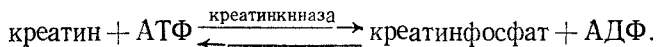
НАДН и НАДФН в щелочных экстрактах после спонтанного окисления до НАД⁺ и НАДФ⁺ определяют описанными выше методами. При низком содержании восстановленных никотинамидных коферментов в ткани можно воспользоваться для их определения более чувствительным методом Слейтера (см. ссылку 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Современные методы в биохимии/Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1964.
2. Практикум по биохимии/Под ред. Н. П. Мешковой и С. Е. Северина. М., 1979.
3. Методы исследования нуклеиновых кислот/Под ред. А. Н. Белозерского. М., 1970.
4. Цейтлин Л. А. Никотинамидные коферменты//Усп. биол. хим. 1967. Т. 8. С. 249.
5. Пасос Ф., Телепнева В. И. Содержание никотинамидных коферментов в нормальной и регенерирующей печени крыс/Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1985. Т. XCIX, № 4 С 432

III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕАТИНА И ФОСФОКРЕАТИНА

Креатин (метилгуанидинуксусная кислота) является обязательной составной частью поперечнополосатой мускулатуры. Содержание креатина в скелетных мышцах достигает 400—500 мг%, в сердечной мышце креатина в 2—3 раза меньше. Креатин найден также в ткани мозга (около 100 мг%) и в значительно меньших количествах в паренхиматозных органах (10—50 мг%).) В мышечной ткани креатин содержится как в свободном виде, так и в виде фосфорилированного производного (креатинфосфата, фосфокреатина), который образуется в результате обратимого переноса фосфорильного остатка с АТФ на креатин. Реакция катализируется креатинкиназой (АТФ: креатин—фосфотрансфераза, КФ 2.7.3.2).



Соотношение количества свободного креатина и креатинфосфата в мышечной ткани сильно варьирует: в покоящейся мышце накапливается креатинфосфат, при сокращении происходит распад АТФ, но за счет креатинкиназной реакции она регенерирует, что приводит к увеличению свободного креатина и уменьшению креатинфосфата.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕАТИНА С ДИАЦЕТИЛОМ

Определение свободного креатина проводят в безбелковом растворе, используя цветную реакцию с диацетилом в присутствии α-нафтола.

Реактивы:

1. HClO_4 — 0,5 н. раствор.
2. KOH — 2 н. раствор.
3. Диацетил — 0,05%-ный раствор. 1,6 г диметилглиоксима нагревают в колбе Вюрца на песчаной бане с 200 мл 5 н. раствора H_2SO_4 . Собирают первые 50 мл дистиллята и доводят водой до 100 мл. При этом получается 1%-ный раствор диацетила. Диацетил хранят в холодильнике; перед употреблением разводят.
4. α -нафтол — 1%-ный щелочной раствор, готовят на растворе, содержащем 6 г NaOH и 16 г Na_2CO_3 на 100 мл H_2O .
5. Креатин — стандартный раствор, содержащий 0,5 мкмоль/мл.

Мышечную ткань осторожно срезают по сухожилиям, избегая перерезки мышечных волокон, так как это приводит к сокращению мышечных клеток и увеличению свободного креатина. Изолированную мышцу тотчас же помещают в жидкий азот, измельчают в ступке и делают навески на 200—300 мг. Навески помещают в предварительно охлажденный раствор HClO_4 , объем доводят до 10 мл, тщательно перемешивают и осадок белка сразу же удаляют фильтрованием или центрифугированием на холоде. Отбирают 7—8 мл безбелкового раствора и нейтрализуют его рассчитанным количеством 2 н. KOH . Раствор охлаждают, выпавший в осадок KClO_4 удаляют фильтрованием и в фильтрате определяют креатин. Для этого к 1 мл фильтрата добавляют 1 мл щелочного раствора α -нафтола и 0,5 мл раствора диацетила. Объем проб доводят водой до 5 мл, тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре в темноте на 30 мин. Окраску колориметрируют при 540 нм. Одновременно с опытными ставят пробы, содержащие 0,1—0,5 мкмоль стандартного раствора креатина. Строят калибровочный график, определяют содержание креатина в опытных пробах и в исследуемой ткани, учитывая произведенные разведения.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОКРЕАТИНА ПО ФОСФОРУ

Креатинфосфат, характеризующийся высокой лабильностью в кислой среде, можно определить по содержанию фосфора методом Фiske—Суббароу в безбелковом экстракте, из которого предварительно удален неорганический фосфат.

Реактивы:

1. Магнезиальная смесь (с. 38).
2. Реактивы для определения фосфата (с. 34).

К 1 мл безбелкового раствора (полученного, как при определении креатина) приливают 1,5 мл магнезиальной смеси, добавляют 1 каплю фенолфталеина и проводят осаждение неорганического фосфата (с. 38). Осадок неорганического фосфата удаляют фильтрованием.

Отбирают 1,5 мл фильтрата и проводят в нем определение фосфора (с. 33). Рассчитывают количество креатинфосфата во взятой пробе.

ЛИТЕРАТУРА

Eggleston P et al. The estimation of creatine and of diacetyl//Biochem J. 1943. Vol. 37. P. 526.

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТИДИНСОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ

Гистидинсодержащие дипептиды — карнозин (β -аланилгистидин) и анзерин (β -аланил-1-метилгистидин) являются характерной составной частью скелетной мускулатуры позвоночных животных. Содержание дипептидов может достигать 1% на влажный вес ткани. При этом у некоторых видов животных преобладает карнозин, у других анзерин; из мышц змей выделен изомер анзерина β -аланил-3-метилгистидин (офидин, баленин). В сердечной мышце и ткани мозга дипептидов мало. В небольшом количестве карнозин обнаружен также в обонятельных луковицах млекопитающих. Из мозговой ткани выделен гомолог карнозина γ -аминобутирилгистидин.

Гистидинсодержащие дипептиды определяют в безбелковом экстракте мышц после разделения их методами хроматографии на бумаге, в тонком слое силикагеля или ионообменной хроматографии на колонке (в автоматическом анализаторе аминокислот). Как и все первичные амины, дипептиды можно обнаружить по реакции с нингидрином, флуорескамином и с *o*-фталевым диальдегидом. Карнозин, кроме того, может быть определен по цветной реакции Паули с диазотированной сульфаниловой кислотой.

Препаративное выделение дипептидов из безбелкового экстракта осуществляется в виде ртутных солей или хроматографией на колонках с ионообменными смолами.

Получение безбелкового экстракта мышечной ткани

Белки в экстракте мышечной ткани осаждают хлорной кислотой или спиртом. Во втором случае безбелковый мышечный экстракт не содержит солей.

Реактивы:

1. HClO_4 — 0,5 н. раствор.
2. KOH — 5 н. раствор.
3. Этиловый спирт — 96% - и 80% -ный.
4. Хлороформ.

Осаждение хлорной кислотой. Навеску мышечной ткани (3—5 г) освобождают от жира, соединительной ткани и измельчают ножницами на холоде. К кашице добавляют 5 объемов охлажденного 0,5 н. раствора HClO_4 , гомогенизируют или тщательно растирают в ступке. Суспензию центрифугируют (20 мин, 1000 g), надосадочную жидкость собирают, осадок вновь суспендируют в 1—1,5 объемах хлорной кислоты. Промывные воды соединяют с центрифугатом. Хлорную кислоту удаляют в виде перхлората калия (с. 29). Полученный центрифугат упаривают на роторном испарителе при температуре 40—45° С.

Осаждение белков спиртом. Навеску (2—3 г) измельченной ножницами на холоде ткани переносят в гомогенизатор с 5 объемами охлажденного 96%-ного этанола; гомогенат сливают в центрифужный стакан, оставляют при комнатной температуре на 20 мин, затем центрифугируют 10 мин при 3000 g. Надосадочную жидкость сливают в колбу с узким горлом (при обработке 2—3 г мышц объем колбы 200 мл, при получении экстракта из большой навески можно пользоваться делительной воронкой), осадок трижды промывают 15 мл

80%-ного этанола, сливая центрифугат в колбу. К спиртовому экстракту приливают хлороформ (так, чтобы верхняя граница жидкости оказалась в узкой части колбы), встряхивают в течение 15 мин и оставляют для отстаивания. Когда четко обозначится граница между водным и спирто-хлороформным слоями, водный слой отсасывают шприцем, а в колбу приливают воду (до прежнего уровня), встряхивают и оставляют для расслаивания. Водный слой отсасывают и присоединяют к первому. Эту операцию повторяют еще 2 раза. Объединенный водный раствор упаривают на роторном испарителе.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРНОЗИНА В БЕЗБЕЛКОВОМ ЭКСТРАКТЕ ПО ДИАЗОРЕАКЦИИ

Реактивы:

1. Сульфаниловая кислота — раствор содержит 0,9 г сульфаниловой кислоты, 9 мл концентрированной HCl, воды до 100 мл.
2. NaNO_2 — 5%-ный раствор, свежеприготовленный.
3. Диазотированная сульфаниловая кислота. В колбу, стоящую во льду, помещают 6 мл раствора сульфаниловой кислоты, приливают туда 6 мл свежеприготовленного раствора NaNO_2 , перемешивают и оставляют на 5 мин. Прибавляют при помешивании еще 24 мл NaNO_2 и через 5 мин доливают водой до 100 мл. Каждый раз готовят свежий раствор (на льду хранится в течение 5—6 ч).
4. Na_2CO_3 безводный — 10%-ный раствор.
5. Карнозин — стандартный раствор 0,5 мг/мл.

Безбелковый экстракт после упаривания на роторном испарителе растворяют в 1—2 мл воды. Отбирают различные количества этого раствора, доводят водой до 2 мл, приливают 3 мл диазореактива, хорошо перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем добавляют 3 мл 10%-ного раствора соды, перемешивают и через 10 мин колориметрируют при 490 нм. Следует убедиться в том, что интенсивность образующейся окраски пропорциональна количеству исследуемого раствора, взятого для определения.

Количество карнозина рассчитывают с помощью калибровочного графика, построенного по стандартному раствору карнозина, содержащему от 0,05 до 0,5 мкмоль в пробе. Рассчитывают количество карнозина в микромолях на 1 г ткани.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Дипептиды и составляющие их аминокислоты хорошо разделяются методом бумажной хроматографии (с. 126) в водонасыщенном феноле или системе *n*-бутанол—пропанол—20%-ный аммиак в соотношении 2:2:1. Хроматограмму обрабатывают раствором нингидрина или диазотированной сульфаниловой кислотой (для выявления карнозина и гистидина).

Реактивы:

1. Фенол — перегнанный, водонасыщенный (с. 168).
2. HCl — концентрированная.
3. Ацетон.
4. Нингидрин — 0,5%-ный раствор в ацетоне (с. 127).

5. Хроматографическая бумага (с. 127).
6. Стандартные растворы карнозина и анзерина — 0,01 М растворы.
7. Смесь для элюции — 0,1 н. раствор NaHCO_3 смешивают с этиловым спиртом в соотношении 1 : 1.
8. Диазотированная сульфаниловая кислота. Приготовление см. на с. 192, но раствор должен быть в 2 раза более концентрированным, т. е. его доводят водой до 50 мл.
9. Na_2CO_3 — 20%- и 1%-ные растворы.

Подготовка хроматографической камеры. На дно камеры (см. рис. 17) помещают кристаллизатор или чашку Петри с водонасыщенным раствором фенола. Туда же ставят стаканчик со смесью концентрированной HCl и воды в соотношении 3 : 1, камеру закрывают и оставляют для насыщения парами растворителя.

Проведение хроматографического разделения. На листе хроматографической бумаги нужного размера на расстоянии 4 см от нижнего края проводят стартовую линию, на которую наносят исследуемый раствор, содержащий дипептиды. Безбелковый экстракт ткани после упаривания на роторном испарителе чаще всего растворяют в смеси $\text{HCOOH}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (7 : 5 : 13) или в 10%-ном изопропанол, чтобы 1 мл раствора соответствовал 1,5—2 г ткани и наносят на хроматограмму небольшими порциями (0,01—0,03 мл), подсушивая бумагу теплым воздухом. На эту же хроматограмму наносят стандартные растворы карнозина и анзерина, содержащие по 0,03—0,05 мкмоль в пятне. Бумагу сшивают в виде цилиндра (следят, чтобы края не соприкасались) и помещают в хроматографическую камеру в строго вертикальном положении. Когда фронт растворителя дойдет до верхнего края бумаги, хроматограмму вынимают и высушивают под тягой в течение 2—3 сут. От следов фенола хроматограмму отмывают горячим ацетоном. Для этого сухую хроматограмму сворачивают трубочкой, перевязывают ниткой, помещают в цилиндр, заливают кипящим ацетоном и оставляют на 10—15 мин; промывание повторяют 2—3 раза. Высушивают под тягой.

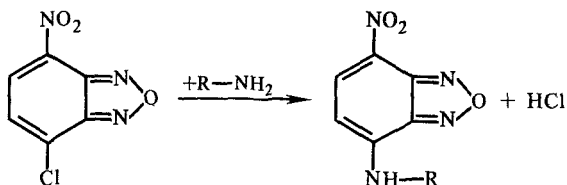
Проявление хроматограммы. Раствор нингидрина наливают в ванночку и равномерно пропитывают им хроматограмму. Затем ее высушивают под тягой и помещают в термостат при 110°C на 5—10 мин. При этом пятна карнозина и анзерина приобретают серо-голубую окраску. Элюцию проводят реактивом № 7 в темноте в течение 2—3 ч и затем колориметрируют при 582 нм.

При проявлении на хроматограмме карнозина и гистидина диазореактивом ее опрыскивают из пульверизатора диазотированной сульфаниловой кислотой, затем слегка влажную хроматограмму опрыскивают 20%-ным раствором Na_2CO_3 . Пятна карнозина приобретают интенсивно оранжевую окраску. Окрашенные участки хроматограммы вырезают и элюируют 1%-ным раствором соды. Колориметрируют при 500 нм. Пользуясь стандартным раствором карнозина, строят калибровочный график и рассчитывают содержание дипептида в микромолях на грамм ткани.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ПЛАСТИНКАХ «СИЛУФОЛ»

Метод характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению с хроматографией на бумаге и может быть использован

также для микроопределения дипептидов после их модификации с помощью флуоресцентной метки — 7-хлор-4-нитро-2-окси-1,3-диазолия (НБД-хлорида). НБД-хлорид ковалентно связывается с аминогруппами аминокислот и пептидов и образует производное желтого цвета. Реакция протекает по следующей схеме:



Реактивы:

1. Пластинки «Силуфол».
2. Изопропанол.
3. NH_4OH — концентрированный.
4. НБД-хлорид — 0,8%-ный раствор в спирте.
5. CH_3COONa — насыщенный раствор в этиловом спирте.

5—10 мкл безбелкового экстракта ткани (с. 191) наносят на пластинку «Силуфол» на расстоянии 1,5—2 см от краев и 1,5 см между пятнами. Наносят также стандартные растворы дипептидов (5—10 нмоль). Проводят восходящую хроматографию в системе: изопропанол—аммиак—вода (7 : 2 : 1). Камеру предварительно насыщают парами растворителя. Пластинки высушивают под тягой. Пятна дипептидов выявляют, опрыскивая пластинку раствором нингидрина (с. 135). Затем пластинки высушивают в струе теплого воздуха и выдерживают при 70° С в течение 10 мин. Пятна аминокислот проявляются при комнатной температуре, пятна дипептидов — при нагревании. Окраску сканируют.

Получение НБД-производных дипептидов. К 0,25 мл спиртового экстракта ткани (с. 192) добавляют 0,05 мл смеси НБД-хлорида и насыщенного раствора CH_3COONa в соотношении 4 : 1. Пробу инкубируют 20 мин при 75° С, охлаждают и наносят аликвоты (4—10 мкл) на пластинку «Силуфол». Хроматографию проводят в системе изопропанол — вода (7 : 2). Сканируют при 470 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мешкова Н. П. Дипептиды скелетной мускулатуры — карнозин и анзерин // Усп. биол. хим. 1964. Т. 6. С. 86.
2. Ткачук В. А., Малниновская К. М. Быстрый и высокочувствительный метод количественного определения карнозина и анзерина в тканях животных // Вопр. мед. хим. 1977. Т. 23. № 1. С. 127.
3. Grush K. G. Carnosine and related substances in animal tissues // Comp. Biochem. and Physiol. 1970. Vol. 34. P. 3.

V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Разделение свободных аминокислот в безбелковых экстрактах тканей проводят методами ионообменной хроматографии на колонках (в автоматическом анализаторе аминокислот) и хроматографии на бу-

маге в различных растворителях. Для количественного определения аминокислот применяют те же методы, что и при анализе аминокислотного состава белков (с. 131, 133).

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Реактивы: см. на с. 127.

Экстракт мышечной ткани может быть получен одним из способов, описанных выше (с. 191). После упаривания на ротормном испарителе сухой остаток растворяют в смеси $\text{HCOOH}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (7:5:13) с таким расчетом, чтобы 1 мл раствора соответствовал 1,5—2 г ткани. Раствор наносят на хроматограмму в количестве, эквивалентном 30—50 мг ткани. На ту же хроматограмму рядом с исследуемыми растворами наносят растворы аминокислот-«свидетелей». Постановку хроматограмм и их обработку см. на с. 126. После обработки нингидрином проводят определение содержания различных аминокислот в экстракте и рассчитывают его в микромолях, миллиграмм-процентах на влажный вес ткани или в процентах к небелковому или общему азоту.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Реактивы:

1. CH_3COOH — 0,04 н. раствор.
2. Реактивы см. на с. 127.

К 1—2 мл крови добавляют равный объем 0,04 н. раствора CH_3COOH , нагревают на кипящей водяной бане 2—3 мин, охлаждают и осадок белка отделяют центрифугированием. Центрифугат сливают и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,1—0,2 мл смеси $\text{HCOOH}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$ (7:5:13), нерастворившийся осадок отбрасывают. На хроматограмму наносят 0,01—0,02 мл полученного раствора и стандартные смеси аминокислот и хроматографируют в бутанолуксусной смеси. После разгонки хроматограммы обрабатывают нингидрином, идентифицируют аминокислоты и проводят их количественное определение. Содержание аминокислот в сыворотке крови выражают в микромолях, миллиграмм-процентах или процентах к небелковому азоту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Майстер А. Биохимия аминокислот. М., 1961.
2. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге//Современные методы в биохимии. М., 1964. С. 162.
3. Литература к разделу «Определение аминокислотного состава белков и пептидов».

Раздел «Энзимология» рассчитан на студентов, уже познакомившихся с некоторыми современными методами химии белка: определением концентрации белка, хроматографией, электрофорезом и др. Основная цель его состоит в том, чтобы дать возможность студентам приобрести навыки экспериментальной работы, необходимые для начинающего энзимолога. В ходе практикума студенты осваивают методы выделения и очистки какого-либо фермента, а также изучают свойства полученного препарата. В связи с этим приводятся общие указания по работе с ферментами, способам их очистки, правилам определения каталитической активности и кинетических свойств. Во второй части раздела описываются методы выделения ферментов из пекарских дрожжей и животных тканей (скелетных мышц, печени). Поскольку современные методы очистки ферментов включают большое разнообразие приемов, в ряде случаев для получения одного и того же фермента дается описание 2—3 методик, которые могут быть использованы в соответствии с уровнем оснащённости лаборатории. Кроме того, для ферментов из разных источников приводятся различные методы выделения.

Учитывая важное практическое значение иммобилизации ферментов, а также возможность использования иммобилизованных препаратов ферментов в фундаментальных исследованиях, в раздел включен ряд задач по иммобилизации препаратов ферментов, выделенных студентами самостоятельно.

Практическая работа в лаборатории сопровождается проведением семинаров, где рассматриваются теоретические вопросы, связанные со способами очистки ферментов, оптимизацией методов определения активности, а также вопросы ферментативной кинетики растворимых и иммобилизованных ферментов. Обсуждаются и основные экспериментальные результаты, полученные студентами.

1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ

Большинство ферментов являются лабильными белками. При переводе их в экстракт они лишаются своего естественного (в клетке) окружения и легко подвергаются денатурации и инактивации под влиянием различных факторов. В связи с этим при выделении и очистке ферментов необходимо соблюдать целый ряд предосторожностей. Как правило, все операции следует проводить при 2—4° С (лучше — в холодной комнате), а фракционирование органическими растворителями — при температуре ниже 0° С.

В исходном экстракте ферменты относительно стабильны, что объясняется наличием большого количества других белков. В процессе очистки стабильность выделяемого фермента снижается, поэтому

вся работа должна проводиться по возможности быстро, особенно на тех стадиях, на которых фермент подвергается жестким воздействиям, таким, например, как фракционирование органическими растворителями.

С помощью соответствующего буфера необходимо поддерживать значение pH в достаточно узком диапазоне, так как ферменты весьма чувствительны к его изменению. Контроль pH осуществляют с помощью pH-метра. Добавление кислоты или щелочи в процессе работы делают осторожно, по стенке сосуда, с помощью капилляра или пипетки при интенсивном перемешивании.

Химические реактивы должны быть высокой степени чистоты. В противном случае их перегоняют (жидкие) или перекристаллизовывают. Особое внимание следует обратить на качество сульфата аммония, который часто используется при выделении многих ферментов. Когда фермент характеризуется повышенной чувствительностью к ионам тяжелых металлов, рекомендуется перекристаллизацию сульфата аммония проводить в присутствии ЭДТА (если это вещество не влияет на активность фермента) в концентрации $\sim 0,5\text{--}2,0$ г/л.

Для работы с ферментами в большинстве случаев используют бидистиллированную воду.

При выделении фермента на разных стадиях его очистки требуется интенсивное перемешивание раствора. Чтобы предотвратить сильное вспенивание и возможность денатурации фермента на поверхности раздела, используют различные типы мешалок. Целесообразно использовать мешалки с большими лопастями, что дает возможность, не снижая эффективности перемешивания, снизить скорость их вращения. Лопasti мешалки должны быть как можно глубже погружены в перемешиваемый раствор. При работе с небольшими объемами удобно использовать магнитные мешалки.

При добавлении к ферментному раствору соли может происходить интенсивное выделение пузырьков воздуха. Поэтому необходимо предварительно ее измельчить и добавлять небольшими порциями. Переливать раствор из сосуда в сосуд нужно медленно, по стенке сосуда, с помощью стеклянной палочки.

Образующиеся в процессе фракционирования осадки в большинстве случаев отделяют от маточного раствора на рефрижераторной центрифуге. Значения g , указываемые в предлагаемых методиках выделения ферментов, можно, как правило, снижать, соответственно увеличивая время центрифугирования (при фракционировании органическими растворителями этого делать не следует). Всегда нужно стремиться получать осадки максимальной плотности: это увеличивает эффективность фракционирования, если выделяемый фермент находится в осадке, и повышает его общий выход, если он находится в маточном растворе. Получение плотного осадка после осаждения фермента органическими растворителями позволяет быстро понизить их концентрацию последующим добавлением небольшого объема воды или буферного раствора.

При работе с большими объемами и осадками, которые плохо отделяются центрифугированием, можно использовать фильтрование на химических воронках большого диаметра через складчатый фильтр.

В некоторых случаях более эффективным оказывается фильтрование под вакуумом. Однако важно, чтобы при этом не происходило вспенивание раствора, так как оно может привести к денатурации фермента.

1. ЭКСТРАКЦИЯ, МЕТОДЫ ОЧИСТКИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Перед тем как приступить к выделению и очистке того или иного фермента, необходимо выбрать удовлетворительный тест для его идентификации и количественного определения. Прямые методы существуют лишь для очень ограниченного круга ферментов, поэтому используют способность ферментов катализировать специфическую реакцию. Чтобы иметь возможность контролировать степень очистки фермента, его активность относят на 1 мг общего белка (так называемая «удельная активность»).

Так как в процессе выделения фермента необходимо знать лишь относительную активность на отдельных стадиях очистки, то выражать ее можно в условных единицах (например, в единицах оптической плотности). Их выбор определяется методом измерения активности. После получения гомогенного или высокоочищенного препарата фермента его активность и удельная активность должны быть определены с использованием наиболее точных методов их измерения и выражены в международных единицах. Результаты очистки фермента суммируют в таблице:

Стадия очистки	Объем ферментного раствора	Активность в 1 мл	Общая активность	Белок, мг	Удельная активность	Степень очистки	Выход фермента, % от исходной активности

Экстракция

Работу по выделению фермента начинают с разрушения клеточной оболочки тканей, в результате чего фермент переходит в экстрагирующий раствор. Мышечную ткань можно разрушить с помощью мясорубки, а также гомогенизатора. Клеточную оболочку в ткани печени удобно разрушать обработкой ацетоном. Для этого ее помещают в гомогенизатор, заливают несколькими объемами ацетона, предварительно охлажденного до -20°C , и гомогенизируют на холоде 1—2 мин. Полученный гомогенат быстро фильтруют на воронке с отсасыванием. Осадок еще раз аналогично обрабатывают ацетоном, затем измельчают вручную (в ступке) при комнатной температуре и помещают в вакуум-эксикатор. Ацетоновый порошок может храниться в холодильнике несколько месяцев и использоваться по мере надобности. Обработка ацетоном не только разрушает клеточную оболочку, но также обезвоживает ткань и освобождает ее в значительной степени от липидов. Одним из наиболее часто применяемых способов разрушения клеточной оболочки дрожжей является автолиз. Дрожжи предварительно можно высушить, что позволяет хранить их, как и ацетоновые порошки животных тканей, длительное время в холодильнике (в герметической упаковке). От условий высушивания дрожжей часто зависят выход фермента и его удельная активность.

Для экстракции обычно используют тот или иной буферный раствор. При работе с интенсивно гликолизирующими тканями (например, мышечной) буфер можно заменить слабым раствором щелочи.

Если фермент характеризуется повышенной восприимчивостью к ионам тяжелых металлов и нет уверенности в полном их отсутствии

в используемых реактивах, рекомендуется экстракцию и всю последующую очистку фермента проводить с добавлением ЭДТА.

Клеточный экстракт наряду с интересующим ферментом содержит и другие вещества белковой и небелковой природы. От них избавляются с помощью различных методов фракционирования. Последовательность их применения может быть различной, но целесообразно, в частности, учитывать специфику фермента. Например, если фермент термостабилен, следует, очевидно, начать с термической обработки, что даст возможность сразу же избавиться от большинства термолабильных белков. Обычно белки неустойчивы в кислых растворах, поэтому если фермент выдерживает подкисление, его очистку следует начинать именно с этой стадии и т. д.

Осаждение белков при изменении рН

При выделении фермента используют метод фракционирования белков путем изменения рН. Очистка фермента на этой стадии достигается за счет денатурации белков, которые отделяют центрифугированием. Изменение рН белкового раствора следует осуществлять осторожно, по возможности не использовать сильные кислоты и щелочи. Рекомендуется добавлять уксусную кислоту, трис-буфер, карбонат натрия и др. Добавление соответствующего буфера или кислоты проводят на холоде. Их вносят по каплям, по стенке сосуда, при постоянном перемешивании. После нейтрализации раствора проводят короткую инкубацию при 25—30° С, чтобы перед центрифугированием произошла полная агрегация денатурированных белков.

Термическая обработка

Температура денатурации разных белков неодинакова. Используя даже сравнительно мягкие условия нагревания, можно добиться коагуляции значительной части балластных белков без существенной инактивации выделяемого фермента.

Тепловую обработку лучше проводить в круглодонной колбе (можно и в химическом стакане), помещая ее в водяной термостат. Чтобы ускорить процесс нагревания ферментного раствора, его погружают в водяную баню с температурой, на 20—30° С выше той, при которой пройдет тепловая стадия. Энергичное перемешивание, необходимое для равномерного нагревания, осуществляется быстрым вращением сосуда с раствором или с помощью механической мешалки.

По окончании термической обработки ферментный раствор быстро охлаждают в сосуде с тающим льдом, интенсивно перемешивают, пока температура не снизится на 10—20° С. Охлаждать после тепловой обработки можно и в ацетоновой бане с сухим льдом при температуре около —8° С. Необходимо лишь не допускать замерзания ферментного раствора.

Фракционирование солями

Различные белки выпадают в осадок при разной концентрации соли. Постепенное увеличение ее концентрации дает возможность получить ряд отдельных фракций с преимущественным содержанием в одной из них выделяемого фермента.

Для солевого фракционирования чаще всего используется хорошо растворимый сульфат аммония. Растворимость его мало изменяется в области температуры от 0 до 30° С. Сульфат аммония не оказывает

вредного воздействия на ферменты, а большинство из них — стабилизирует. Если нежелательно увеличение объема ферментного раствора, используют твердую соль, предварительно измельчив ее в ступке, но раствор при этом закисляется. Можно использовать насыщенный раствор сульфата аммония, что особенно удобно на последних стадиях очистки. Предварительно pH раствора сульфата доводят до требуемого значения, что исключает необходимость контроля и доведения pH ферментного раствора в процессе его фракционирования. Сульфат аммония вносят в раствор отдельными порциями, при перемешивании. Если используют твердую соль, последующую порцию добавляют после растворения предыдущей. Тщательное перемешивание и дробное добавление предотвращают локальное повышение концентрации соли выше требуемой, что могло бы привести к загрязнению выделяемой фракции. После растворения последней порции сульфата аммония (или добавления последней порции насыщенного раствора) перемешивание продолжают 15—30 мин, чтобы получить более четкое разделение фракций.

Осадки, образовавшиеся при фракционировании сульфатом аммония, не всегда легко отделяются центрифугированием, особенно при высокой концентрации соли в растворе. Иногда целесообразно использовать быстросфирующий складчатый фильтр. Некоторые ферменты достаточно быстро теряют активность в растворе сульфата аммония высокой концентрации. В этом случае для отделения осадка используют метод центрифугирования, как более быстрый.

Концентрация соли, необходимая для перевода фермента в осадок, зависит от его концентрации, наличия различных примесей. Существенное влияние оказывают также природа используемой для фракционирования соли, а также pH среды и температура. Для четкого воспроизведения результатов необходимо соблюдать условия проведения данной стадии.

Концентрацию сульфата аммония в растворе выражают десятичной дробью (полное насыщение при этом принимают равным 1,0) или в процентах насыщения. Насыщенный раствор имеет 100%-ное насыщение. Как правило, фракционирование сульфатом аммония проводится на холоде, тем не менее 100%-ное насыщение обычно принимается за полное при комнатной температуре.

Количество сульфата аммония (в г), которое необходимо добавить при 20° С для получения заданной степени насыщения, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,533V(C_2 - C_1)}{1 - 0,3 \cdot C_2},$$

где V — объем исходного раствора с концентрацией сульфата аммония, равной C_1 насыщения; C_2 — требуемая степень насыщения. Концентрация соли в данном случае выражается десятичной дробью.

Количество сульфата аммония в граммах, которое нужно добавить к 1 л раствора при 20° С, чтобы из раствора с молярностью M_1 получить раствор с молярностью M_2 , рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{533(M_2 - M_1)}{4,05 - 0,3 M_2}.$$

В обоих случаях принимают, что сульфат аммония при 100%-ном насыщении соответствует 4,05 М раствору.

Наряду с вышеприведенными формулами можно использовать номограмму (рис. 25).

при фракционировании насыщенным раствором сульфата аммония добавляемый его объем (V) находят по формуле:

$$V = \frac{V_0 (C_2 - C_1)}{1 - D_2},$$

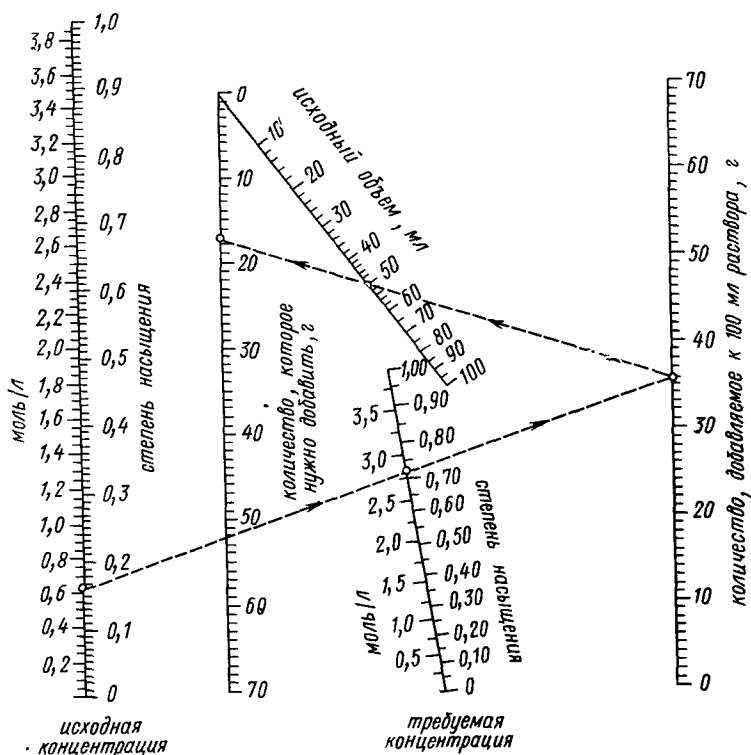


Рис 25 Номограмма, позволяющая определять количество сульфата аммония, необходимого при получении раствора нужной концентрации, при 0°С

где C_1 — исходная, а C_2 — требуемая степень насыщения ферментного раствора сульфатом аммония, выраженные десятичной дробью; V_0 — исходный объем ферментного раствора.

Перед определением активности раствор осадка сульфатно-аммонийной фракции обессоливают или сильно разводят буфером. В маточном растворе измерять активность не имеет смысла, так как при высокой концентрации соли она вообще может не проявляться.

Фракционирование органическими растворителями

В присутствии органических растворителей при комнатной температуре большинство ферментов инактивируются. Поэтому фракционирование проводят при сильном охлаждении. Низкая температура не только предохраняет фермент от инактивации, но и усиливает осаждающее действие органического растворителя.

При наличии в растворе нейтральных солей требуется более высокая концентрация органического растворителя для осаждения белка, что нежелательно. Не рекомендуется, однако, полностью удалять соли, так как в этом случае затрудняется последующее отделение выпавшего осадка. На эффективность фракционирования влияет и pH

среды. наилучшие результаты получаются при рН около 6,0. Исходная концентрация белка в пределах 5—20 мг/мл считается оптимальной.

Для получения низкой температуры используют спиртовую (или ацетоновую) баню. Добавлением небольших кусочков сухого льда можно достичь желаемого охлаждения.

На рис. 26 изображена одна из возможных установок для фракционирования органическими растворителями. Ферментный раствор наливается в стеклянный стакан 3, помещенный в спиртовую баню 4. Уровень спирта после добавления органического растворителя должен несколько превышать уровень жидкости в стакане (определяют заранее).

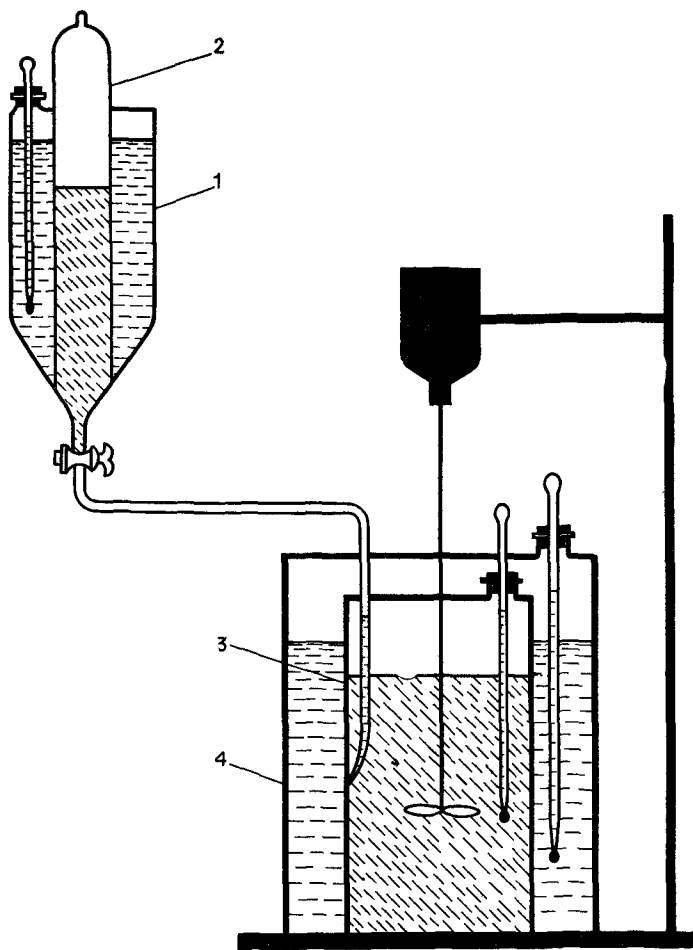


Рис 26. Установка для фракционирования белков органическими растворителями. Спиртовая баня (1) для охлаждения органического растворителя, помещенного в делительную воронку (2); стеклянный стакан с ферментным раствором (3), охлаждающимся в спиртовой бане (4)

Спиртовую баню ставят на магнитную мешалку или используют механическую мешалку (см. рис. 26). Стакан с ферментным раствором должен иметь ровное дно, в противном случае трудно добиться интенсивного и равномерного перемешивания, так как магнит мешалки будет постоянно сбиваться к стенкам стакана.

Органический растворитель, используемый для фракционирования, предварительно охлаждают до 0—минус 30° С (в зависимости от условий фракционирования) и помещают в делительную воронку 2. В такой же степени охлаждают и спирт в кожухе 1.

В бане 4 доводят температуру примерно до —3° С. Ферментный раствор наливают в стакан 3, помещают его в спиртовую баню 4 и сразу же включают мешалку. По достижении температуры ферментного раствора 0° С начинают добавлять из сосуда 2 органический растворитель и следят за тем, чтобы он стекал тонкой струйкой по стенке стакана, успевая перемешиваться с раствором, а не наслаивался бы на его поверхности.

Здесь следует отметить несколько моментов. При 0° С и ниже ферментный раствор может замерзнуть, поэтому нельзя сразу сильно понижать его температуру. С другой стороны, добавление органического растворителя сопровождается повышением температуры ферментного раствора, поэтому его следует приливать постепенно, особенно в самом начале, регулируя скорость его поступления так, чтобы раствор в стакане 3 не нагревался выше 0° С. По мере повышения концентрации органического растворителя температура замерзания раствора понижается и можно вести работу при более сильном охлаждении, что достигается добавлением в баню 4 нескольких кусочков сухого льда. Приливая новые порции органического растворителя, температуру в стакане постепенно понижают до нужного значения. При получении последующих фракций в ферментном растворе уже будет содержаться определенное количество органического растворителя, поэтому не будет и опасности замерзания раствора при минусовой температуре. Не будет происходить и его разогревания.

После добавления органического растворителя рекомендуется продолжать перемешивание еще 15—20 мин при температуре фракционирования. Образовавшиеся осадки отделяют центрифугированием при той же температуре. При более высокой температуре часть осадка может раствориться, а при более низкой часть белков из раствора может выпасть в осадок. Осадки обычно оседают легко, однако увеличение скорости центрифугирования даст возможность снизить его продолжительность. После центрифугирования осадок, содержащий фермент, необходимо растворить в воде или буфере, чтобы снизить концентрацию органического растворителя. Перед последующей обработкой для удаления органического растворителя проводят диализ или используют гель-фильтрацию.

Активность фермента на этой стадии измеряют только после растворения осадка. Высокие концентрации органического растворителя могут существенно исказить результаты.

Метод избирательной адсорбции

Вещества, имеющие большую поверхность частиц (гель фосфата кальция и гель гидроокиси алюминия), характеризуются высокой адсорбционной способностью. Разные белки адсорбируются и элюируются по-разному, что и дает возможность использовать адсорбенты для очистки ферментов. Различают негативную адсорбцию, когда при добавлении адсорбента фермент остается в растворе, и положительную адсорбцию, когда фермент адсорбируется, а часть балластных белков остается в растворе. Наибольший эффект достигается при их совместном использовании, т. е. сначала адсорбируют возможное ко-

личество балластных белков, следующей порцией геля адсорбируют фермент, а затем его элюируют. Адсорбция лучше идет при достаточно низкой концентрации солей в растворе и pH 5—6.

Адсорбционные свойства свежеприготовленных алюминиевого и кальций-фосфатного гелей изменяются при хранении. Поэтому в литературе встречаются рекомендации использовать для работы «постаревшие» (в течение нескольких недель или месяцев) гели. Однако каждый раз требуемое количество геля, необходимое для адсорбции фермента или балластных белков, приходится подбирать экспериментально. Обычно оно не соответствует количествам, использованным в предыдущем выделении или указанным в методике.

Необходимое количество геля подбирают следующим образом. В несколько пробирок наливают одинаковое количество ферментного раствора (минимальный объем) и добавляют разные количества геля. Перемешивают до получения однородной суспензии, центрифугируют и в центрифуге определяют ферментативную активность. То соотношение геля к ферментному раствору, при котором в надосадочной жидкости остается примерно 90% первоначальной активности при адсорбции балластных белков и около 10% при адсорбции исследуемого фермента, считается оптимальным. На основании полученного соотношения рассчитывают количество геля, которое необходимо добавить на весь объем ферментного раствора.

В другом варианте ко всему объему ферментного раствора добавляют определенное (обычно небольшое) количество геля, перемешивают, центрифугируют и в центрифугате, не сливая его с осадка, а только отбирая нужный объем, измеряют ферментативную активность. Процедуру повторяют до тех пор, пока не будет достигнут нужный эффект.

Для адсорбции белков достаточно перемешать раствор после добавления геля до получения однородной суспензии. После центрифугирования осадок отбрасывают, если ставилась задача адсорбировать балластные белки. Если адсорбирован фермент, осадок геля промывают несколько раз водой или слабым буферным раствором (если это не сопровождается потерей фермента). Для элюции фермента используют слабощелочной буферный раствор более высокой концентрации, чем тот, что использовался при промывании геля. Если фермент элюируется плохо, в буфер для увеличения элюции добавляют соль.

Элюцию фермента с геля также проводят под контролем определения ферментативной активности. Для этого осадок геля 10—15 мин перемешивают с элюирующим буфером, центрифугируют и в надосадочной жидкости измеряют ферментативную активность. Обработку повторяют с новыми порциями буфера (но с меньшими объемами) до тех пор, пока не будет элюировано основное количество фермента.

С помощью избирательной адсорбции можно сконцентрировать ферментный раствор, если первоначальный объем его был большим, а концентрация фермента в нем невысока — элюция обычно осуществляется небольшим объемом.

Кристаллизация

Большое количество ферментов кристаллизуется из раствора сульфата аммония. Необходимым условием кристаллизации является достаточно высокая степень чистоты фермента и оптимальная концентрация его в растворе. Концентрации выше оптимальной также не способствуют получению фермента в кристаллическом виде. Один из

способов кристаллизации фермента заключается в следующем. К раствору фермента определенной концентрации и при фиксированном значении pH медленно, при помешивании (удобно использовать магнитную мешалку) добавляют насыщенный раствор сульфата аммония (предварительно доведенный до того же значения pH, что и ферментный раствор) до появления слабой мутности¹ и оставляют в холодильнике на несколько дней. В ряде случаев в процессе стояния концентрацию сульфата аммония требуется постепенно повышать.

Наряду с использованием сульфата аммония существуют иные способы кристаллизации ферментов, например из раствора спирта (алкогольдегидрогеназа печени), ацетона (уреаза) и др.

При кристаллизации в ряде случаев происходит увеличение удельной активности фермента или (и) освобождение от примесей сопутствующих ферментов. Поэтому данную стадию можно рассматривать как один из способов очистки энзимов.

Критерий чистоты ферментных препаратов

Для определения чистоты (или гомогенности) ферментных препаратов в настоящее время наиболее широко используются ультрацентрифугирование и диск-электрофорез. В основе первого из них лежит различная скорость седиментации в ультрацентрифуге белков с различной молекулярной массой (и различной формой молекул). Одним из ограничений данного метода является то, что разные белки могут иметь одну и ту же величину седиментации и не разделяться при ультрацентрифугировании. С другой стороны, белок в растворе может находиться в виде нескольких форм, различающихся по степени агрегации, а следовательно, и по молекулярной массе. Если эти формы не превращаются одна в другую или превращения осуществляются достаточно медленно, на седиментограмме обнаружится несколько пиков, что, однако, не будет свидетельствовать о наличии примесных белков в исследуемом препарате фермента. Недостатком метода является также его невысокая чувствительность, что не позволяет обнаруживать малые количества примесных белков.

Более высокой разрешающей способностью характеризуется метод диск-электрофореза, который не требует сложного и дорогостоящего оборудования и может быть воспроизведен в любой лаборатории (с. 94).

Для проверки однородности ферментного препарата недостаточно одного метода. Если примесь является ферментом с высокой удельной активностью, это может вызвать нежелательные осложнения при использовании ферментного препарата, например в аналитических целях. В таком случае ферментативный контроль на наличие побочных активностей совершенно необходим.

2. ХРАНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Если фермент кристаллизуется (или осаждается) из раствора сульфата аммония, его хранят в этом растворе в виде суспензии; на холоде его каталитическая активность, как правило, остается практически неизменной достаточно долго. Перед работой часть суспензии центрифугируют, осадок растворяют в буфере и используют для работы. Если фермент имеет высокую удельную активность, можно исполь-

¹ Используют также диализ ферментного раствора против насыщенного раствора сульфата аммония, опять же до появления слабой мутности.

зовать суспензию и не центрифугируя, так как в данном случае ее сильно разводят и сульфат аммония оказывается в столь низкой концентрации, что не влияет на ферментатическую реакцию.

Другой способ хранения — в замороженном состоянии (при температуре ниже -25°C). Перед замораживанием ферментный раствор разливают по отдельным пробиркам, чтобы каждую порцию подвергать замораживанию и оттаиванию только один раз.

3. ВЫРАЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Единицы активности. Согласно рекомендации комиссии по ферментам Международного биохимического союза за единицу активности фермента (E) принимают то его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту при заданных условиях определения. Рекомендуемая температура 30°C (или указывают фактическую температуру, при которой проводилось определение). Остальные условия (рН, концентрация субстрата, кофакторов и др.) должны быть оптимальными. При бимолекулярной реакции $A+B=V+Г$ за единицу фермента принимают то его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль A или B , или 2 мкмоль A , если $B=A$, за 1 мин. Если фермент атакует более чем одну связь, например при действии на полимерную молекулу, расчет ведется на 1 мк·экв затронутых реакцией групп.

Удельная активность выражается числом единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка. **Молекулярная активность** характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению одной молекулой фермента за 1 мин. Когда известно количество активных центров в молекуле фермента, вводится понятие **активности каталитического центра**. Она характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению за 1 мин при расчете на 1 каталитический центр.

II. ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата (субстратов), рН, температуры, присутствия активаторов или ингибиторов, природы буфера, его ионной силы и др. Ряд факторов оказывает влияние на **стабильность** фермента, вызывая необратимые изменения его нативной конформации. Это необходимо учитывать, подбирая условия измерения активности (рН, температура, время инкубации). Подробное исследование стабильности ферментов описано ниже.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Если фермент подчиняется кинетике Михаэлиса—Ментен

$$v = \frac{VS}{K_m + S},$$

можно определить кинетические параметры реакции: константу Михаэлиса (K_m) и максимальную скорость (V). В случае односубстратной реакции задача сводится к получению серии данных, характеризующих зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата, и к соответствующей графической обработке этих данных. В более часто встречающихся случаях двух- или трехсубстратной реакции

эксперимент ставят таким образом, чтобы, меняя концентрацию одного из субстратов, обеспечить присутствие другого (других) в насыщающей концентрации. При этом необходимо иметь в виду, что концентрация одного из субстратов обычно влияет на K_m другого и характер этого влияния зависит от механизма реакции. Например, в случае ферментов, действующих по механизму, «пинг-понг», увеличение концентрации одного субстрата вызывает рост K_m для другого.

Условия проведения ферментативной реакции. Прежде чем приступить к постановке кинетических экспериментов, необходимо выполнить ряд условий.

1. Подобрать концентрацию фермента, при которой скорость реакции была бы пропорциональна количеству добавленного белка-катализатора. Если подобная зависимость не наблюдается, это может указывать на присутствие в препарате фермента ингибитора либо активатора, а также на возможную диссоциацию фермента при разведении на субединицы, обладающие иными кинетическими свойствами, чем олигомер.

2. Подобрать условия инкубации, при которых обеспечивалось бы постоянство всех параметров кроме того, который исследуется. Это значит, что в ходе эксперимента не должна изменяться температура. Изменение температуры может произойти, например, в тех случаях, когда инкубационная смесь не термостатирована, а эксперимент занимает длительное время либо когда отдельные компоненты реакционной среды, смешиваются в разных соотношениях, имеют неодинаковую температуру.

3. Начинать реакцию следует внесением фермента или одного из субстратов, добавляемых в минимальном объеме при быстром перемешивании реакционной смеси. Это удобно делать с помощью специальных пластиковых палочек, уплощенных на конце. Одновременно отмечают начало реакции.

4. Обеспечить условия измерения *начальной скорости реакции*. Скорость ферментативной реакции, измеряемая по количеству превращенного субстрата или образовавшегося продукта реакции, со временем снижается. Это можно объяснить целым рядом причин: снижением степени насыщения фермента субстратом, который расходуется в процессе ферментативной реакции, так что концентрация его в системе уменьшается; увеличением скорости обратной реакции (если реакция обратима); возможным ингибированием фермента образующимися продуктами реакции; изменением исходных условий, например снижением pH в ходе реакции; инактивацией фермента и др.

Скорость реакции в любой момент времени (рис. 27) определяется как тангенс угла наклона касательной к кривой. Начальная скорость — это тангенс угла наклона касательной к кривой в нулевой точке. Однако проведение такой касательной не обеспечивает достаточной точности определения начальной скорости, поэтому выбирают экспериментальные условия, при которых измерения можно проводить на начальном участке кривой, имеющем линейный характер. Это может быть достигнуто снижением концентрации фермента либо увеличением чувствительности прибора.

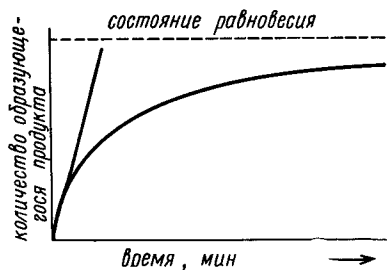


Рис. 27. Ход ферментативной реакции во времени. Объяснение в тексте

Методы измерения активности ферментов делят на две группы: одни основаны на остановке реакции через определенные промежутки времени, в других прирост продукта или убыль субстрата регистрируются непрерывно.

В первом случае возможны два варианта: а) из реакционной среды периодически отбирают пробы, в которых (в строго фиксированные интервалы времени) реакция останавливается путем быстрой инактивации фермента; б) готовят серию параллельных проб, останавливая реакцию в них через различные интервалы времени.

Методы непрерывной регистрации ферментативной активности часто основаны на том, что в ходе реакции происходит убыль или нарастание количества вещества, обладающего характерными спектральными свойствами. Таким образом измеряют активность дегидрогеназ, использующих НАДН и НАДФН (с. 7).

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ В СИСТЕМЕ СОПРЯЖЕННЫХ РЕАКЦИЙ

Широкое распространение приобрели методы определения активности с использованием вспомогательных ферментов. Они основаны на том, что продукт изучаемой реакции служит субстратом вспомогательного фермента. Этот метод имеет особое преимущество в тех случаях, когда непрерывная регистрация скорости изучаемой реакции затруднена или когда продукт реакции является ингибитором исследуемого фермента.

В качестве сопрягающих ферментов часто используют дегидрогеназы и их коферменты в окисленной или восстановленной форме. Например, активность гексокиназы определяют в системе, содержащей дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и НАДФ. Скорость восстановления НАДФ соответствует скорости гексокиназной реакции. Иногда используют системы двойного или тройного сопряжения, однако конечным звеном такой системы является соответствующая дегидрогеназа (например, при определении активности фосфофруктокиназы, креатинкиназы). При определении активности в сопряженной системе следует учитывать ряд условий.

Во-первых, сопрягающий фермент не должен лимитировать скорость изучаемой реакции. Практически 30-кратный избыток его по отношению к активности изучаемого фермента обеспечивает достаточно быстрое превращение образующегося продукта. Чтобы убедиться в правильности выбранных количеств сопрягающего фермента, полезно провести сравнительное определение активности с большим и меньшим (в 4 раза) количеством. Если скорость изучаемого фермента при этом не изменяется, сопрягающая система подобрана правильно. Удобно изучать скорость реакции, когда добавленное количество вспомогательного фермента обеспечивает изменение оптической плотности на 0,03—0,20 в минуту.

Во-вторых, сопрягающий фермент должен обладать высоким сродством по отношению к своему субстрату, т. е. продукту изучаемой реакции. Необходимо проверить, не содержит ли препарат сопрягающего фермента примесь исследуемого. Для этого добавляют в контрольную пробу все компоненты реакции, кроме фермента, активность

которого измеряют. Если определяемый фермент отсутствует в качестве примеси, реакция не идет (оптическая плотность не изменяется).

В-третьих, в реакционной среде, содержащей пиридиновые нуклеотиды, может происходить неспецифическое изменение оптической плотности. Чтобы выяснить, не связано ли оно с неустойчивостью кофермента, в контрольной пробе, не содержащей один из субстратов реакции, определяют его количество.

В-четвертых, присутствие в среде инкубации соединений, необходимых для полноценной работы сопрягающей системы (субстрат, кофакторы, активаторы), может существенно сказаться на скорости изучаемой реакции. Чтобы исключить такую возможность, проводят предварительные эксперименты, где процессы образования продукта реакции и его определения разобщены. С этой целью применяют метод отбора проб: проводят изучаемую реакцию в отсутствие компонентов сопрягающей системы, останавливают реакцию, и накопившийся продукт реакции определяют количественно уже с помощью сопрягающей системы. В пробу, содержащую все компоненты сопрягающей системы, вносят порцию определяемого продукта, и реакцию, катализируемую сопрягающим ферментом, доводят до конца, т. е. до прекращения регистрируемых изменений оптической плотности.

В-пятых, при определении активности ферментов с помощью сопрягающих систем реакцию удобно начинать либо одним из субстратов изучаемой реакции, либо самим ферментом. Такая постановка позволяет предварительно выявить возможность протекания побочных реакций. Кроме того, присутствие системы сопряжения в среде инкубации до начала реакции обеспечит «плавную» регистрацию образующегося продукта.

Таким образом, количество сопрягающего фермента можно подобрать экспериментально. Его можно также рассчитать, зная кинетические параметры системы. Она должна находиться в стационарном состоянии, когда скорость реакции, катализируемая индикаторным ферментом, равна скорости реакции, осуществляемой тем ферментом, активность которого исследуется. Расчеты, проведенные для ситуации, при которой через 1 мин после запуска реакции достигается 98% истинной скорости, показывают, что количество сопрягающего фермента может быть определено из соотношения:

$$\frac{V}{K_m^p} = 3,9 \text{ мин}^{-1}.$$

Величина V , выраженная в $\text{мкмоль} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, — это число единиц вспомогательного фермента в 1 мл раствора; K_m^p — константа Михаэлиса для продукта (p) реакции, катализируемой определяемым ферментом. С учетом ряда поправок минимальным считают количество сопрягающего фермента, равное $5K_m^p$. При этом следует иметь в виду, что величины K_m и V относятся к условиям, в которых проводят тестирование (они могут отличаться от величин, определяемых в оптимальных для сопрягающего фермента условиях).

Соотношение $V = 5K_m^p$ справедливо для случая, при котором стационарное состояние достигается через 1 мин после начала реакции; если требуется более короткое время, количество сопрягающего фермента следует увеличить. Так, для интервала времени 10 с $V = 30K_m^p$. Анализ более сложных случаев (использование нескольких сопрягающих ферментов) и подробные расчеты приведены в книге Р. Скоупса (см. список литературы, с. 216).

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

Проводят серию измерений начальной скорости реакции в стандартных условиях, изменяя концентрацию субстрата (либо одного из субстратов) при насыщающих концентрациях остальных в диапазоне $0,1 K_m - 10 K_m$. Количество экспериментальных точек, соответствующих разным концентрациям субстрата, должно быть не менее 6—7. Получают зависимость v_0 от $[S]$, показанную на рис. 28.

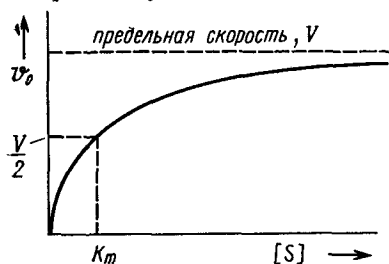


Рис. 28. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата

Для более точного определения величины V (которое трудно осуществить экспериментально) используют линейные преобразования, уравнения Михаэлиса—Ментен, предложенные Лайнуивером—Бэрком, Иди—Хофсти и др. В со-

ответствии с указанными уравнениями строят графики, представленные на рис. 29 и 30:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V[S]} + \frac{1}{V};$$

$$v = V - K_m \frac{v}{[S]}.$$

Весьма удобным является метод, предложенный Эйзендалем и Корниш—Боденом, в котором на графике откладываются не обрат-

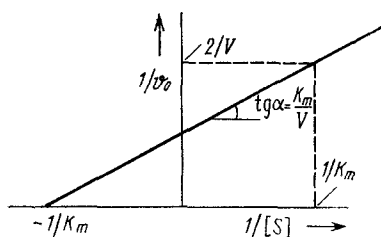


Рис. 29. График Лайнуивера—Бэрка. Определение величины константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции (K_m и V)

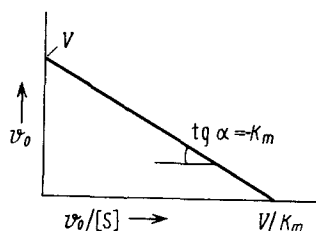


Рис. 30. График Иди—Хофсти. Определение величин K_m и V

ные величины, а значения $[S]$ и соответствующие им величины v_0 . Уравнение Михаэлиса—Ментен преобразуется следующим образом:

$$\frac{V}{v} - \frac{K_m}{[S]} = 1.$$

Эта зависимость выражается графически, как показано на рис. 31. Экспериментальные данные обрабатывают, используя указанные графические способы. Определяют величины K_m и V . В случае двух- и трехсубстратных реакций определяют K_m для разных субстратов. По найденным величинам V рассчитывают удельную активность препарата фермента.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ pH

Так как величины K_m и V могут по-разному зависеть от pH, исследование, проводимое при ненасыщающих концентрациях субстрата, дает информацию, которую трудно интерпретировать. Поэтому необходима постановка экспериментов по определению влияния pH на K_m и V . Следует помнить, что концентрация субстрата, являющаяся насыщающей при одном значении pH, при другом может не быть ею. Выбирая буфер, нужно учитывать, чтобы его рК был по возможности близок к оптимуму pH реакции, а также иметь в виду, что при одном и том же pH в разных буферах каталитическая активность может различаться. Отдельные ионы могут оказывать активирующее или ингибирующее влияние на фермент. Поливалентные анионы (фосфат, сульфат, цитрат) могут конкурировать с отрицательно заряженным субстратом, вызывая ингибирование реакции. Отдельные компоненты буфера, например ЭДТА, гистидин, цитрат, могут связывать ионы металлов, важные для активности некоторых ферментов. Следует иметь в виду, что ионная сила раствора оказывает влияние на активность фермента. Поэтому, изменяя состав реакционной среды, необходимо обеспечивать постоянство ионной силы.

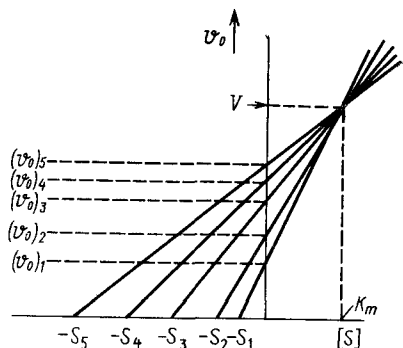


Рис. 31. Прямой линейный график Эйнзенталя и Корниш-Боудена. Определение величин K_m и V

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Скорость ферментативной реакции повышается в 1,5—2,2 раза с повышением температуры на 10°C . Поэтому такого понятия, как «температурный оптимум активности», не существует. Вместе с тем в условиях эксперимента существует определенное значение температуры, при котором активность фермента максимальна; дальнейшее увеличение температуры приводит к снижению скорости реакции. Следует иметь в виду, что это происходит в результате денатурации части фермента. Чем короче время инкубации, тем выше кажущийся температурный оптимум. На рис. 32 видно, что при времени реакции t_1 активность максимальна при 70°C , а при времени t_2 — при 50°C . Оптимальная температура действия фермента зависит от соотношения между влиянием температуры на скорость ферментативной реакции, с одной стороны, и на скорость денатурации фермента — с другой. Из сказанного ясно, что для исследования влияния температуры на собственно ферментативную реакцию необходимо подобрать условия, обеспечивающие сохранение нативной структуры белка. Затем определяют зависимость различных кинетических параметров фермента от температуры.

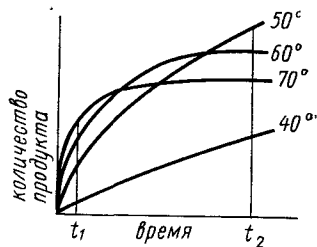
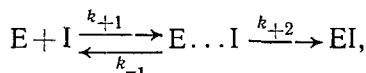


Рис. 32. Кривые хода ферментативной реакции при различных значениях температуры. Объяснение в тексте

7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ

Ингибиторы, специфически взаимодействующие с ферментами, делятся на две группы — необратимые и обратимые. Действие необратимых ингибиторов можно наблюдать, блокируя функционально важные группы ферментов (например, модифицируя SH-группы йодацетатом).

Для изучения структуры активных и регуляторных центров широко применяют химические аналоги субстратов, коферментов, эффекторов, способных стехиометрически и необратимо ингибировать фермент. Кинетический анализ полученных данных проводят методом Китца и Вильсона, основанным на предположении, что взаимодействие фермента с ингибитором протекает по следующей схеме.



где k_{-1}/k_{+1} — константа диссоциации (K_i) обратимого фермент-ингибиторного комплекса ($E \dots I$), k_{+2} — константа скорости необратимой модификации фермента. Зависимость между кинетическими константами и концентрацией ингибитора выражается уравнением прямой в координатах $1/k_{\text{каж}}$ от $1/I$:

$$\frac{1}{k_{\text{каж}}} = \frac{1}{k_{+2}} + \frac{K_i}{k_{+2}} \cdot \frac{1}{[I]}.$$

Кажущуюся константу скорости (или константу скорости реакции псевдопервого порядка $k_{\text{каж}}$) определяют из экспериментальных данных (рис. 33). Величины K_i и k_{+2} рассчитывают из вторичного графика, представленного на рис. 34.

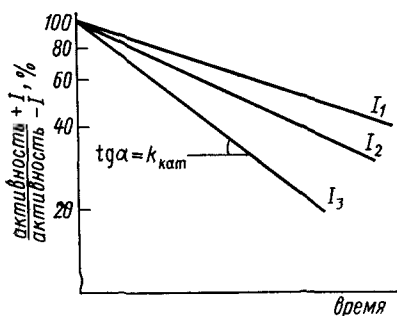


Рис 33 Графическое определение кажущихся констант скорости инактивации для необратимого ингибитора ($I_3 > I_2 > I_1$) методом Китца и Вильсона

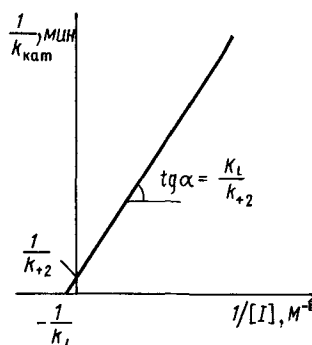


Рис 34 График зависимости кажущихся констант скорости инактивации от концентрации ингибитора в двойных обратных координатах. Объяснение в тексте

Обратимое ингибирование характеризуется равновесием между ферментом и ингибитором. Константа равновесия (K_i) служит мерой их сродства. Обратимые ингибиторы, действие которых приводит к увеличению эффективной K_m , называют конкурентными. Неконкурентные ингибиторы не влияют на величину K_m , но уменьшают максимальную скорость. Существуют ингибиторы, изменяющие как K_m , так и V . В случае конкурентного ингибирования

$$v_i = \frac{V[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}.$$

Величину K_i можно определить методом Лайнуивера и Бэрка по длине отрезка, отсекаемого на оси абсцисс и равного $1/K_p$, где

$$K_p = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (\text{рис. 35, А}).$$

Разделив обе части уравнения на K_m , получим

$$\frac{K_p}{K_m} = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad \text{и} \quad K_i = \frac{[I]}{\frac{K_p}{K_m} - 1},$$

где I — концентрация ингибитора, K_p — кажущаяся константа Михаэлиса в присутствии ингибитора.

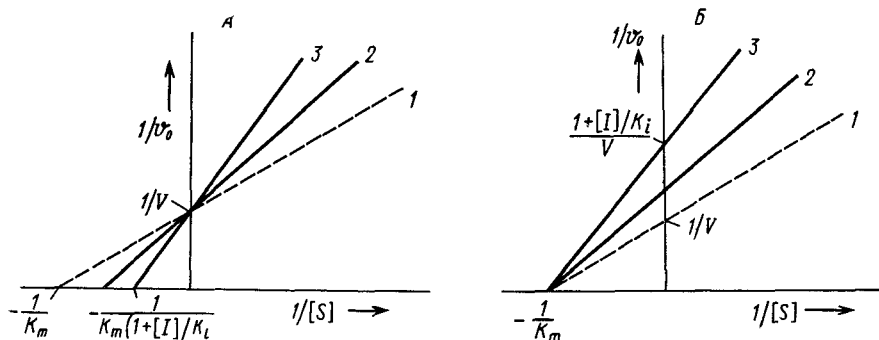


Рис 35 График Лайнуивера—Бэрка для конкурентного (А) и неконкурентного (Б) ингибирования
1 — без ингибитора, 2 и 3 — в присутствии ингибитора

При неконкурентном ингибировании

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{(K_m + S) (1 + [I]/K_i)}.$$

На графике Лайнуивера—Бэрка точка пересечения с осью ординат дает величину $1/V_p$ (V_p — величина V , наблюдаемая в присутствии ингибитора).

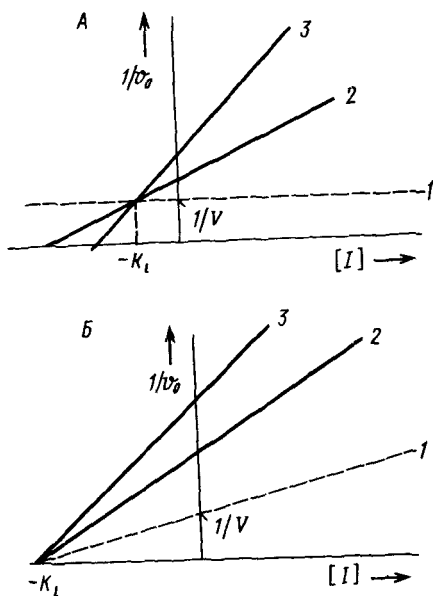
$$V_p = \frac{V}{(1 + [I]/K_i)} \quad (\text{рис. 35, Б}).$$

Отсюда

$$K_i = \frac{[I]}{(V/V_p - 1)}.$$

Для определения типа ингибирования и величины K_i широко используется метод Диксона. Скорость реакции измеряют при варьирующей концентрации ингибитора и постоянной концентрации субстрата. График зависимости $1/v_0$ от $[I]$ представляет собой прямую. Если

получить еще ряд экспериментальных точек при другой концентрации субстрата, прямые пересекутся в точке $-K_i$ при конкурентном ингибировании. Графики Диксона для конкурентного и неконкурентного ингибирования показаны на рис. 36, А и Б.



8. ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Влияние pH на стабильность фермента. Готовят серию пробирок, в каждую из которых помещают буферный раствор с определенным pH (учитывают чувствительность фермента к ионам различной природы) и одинаковое количество фермента. Выдерживают пробы в течение определенного времени при фиксированной температуре, после чего отбирают из каждой пробы определенный объем ра-

Рис 36. Графическое определение констант ингибирования для конкурентного (А) и неконкурентного (Б) ингибиторов методом Диксона

1, 2 и 3 — разные концентрации субстрата.
 S_1 — насыщающая концентрация ($S_2 > S_3$)

створа и помещают его в стандартную смесь для определения активности (при фиксированном значении pH, оптимальном для активности). Эксперимент следует ставить таким образом, чтобы время преинкубации при каждой величине pH было одинаковым. Для этого инкубацию серии проб при различных pH начинают не одновременно, а с интервалом 2—3 мин (это позволит провести определение активности в первой пробе до того, как истечет время преинкубации во второй и т. д.). Необходимо обеспечить условия, при которых внесение пробы в реакционную смесь для измерения активности не изменило бы pH этой смеси.

Влияние температуры на стабильность ферментов. Фермент (концентрация его в пробе может варьировать в широких пределах) инкубируют в течение определенного интервала времени при серии фиксированных значений температуры (2°C , 20°C , 40°C , 60°C), после чего отбирают пробы для определения активности в стандартных условиях.

9. ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Известно большое число ферментов со «сложной» негиперболической кинетикой. Одна из причин отклонения от кинетики Михаэлиса—Ментен может быть связана с аллостерическими свойствами фермента. Для регуляторных ферментов кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата часто имеет сигмоидальную форму. При наличии S-образности резкое увеличение активности происходит в узкой области концентрации субстрата, что может иметь важное значение для функционирования фермента в клетке. В аллостерической регуляции ферментативной активности принимают участие не только

субстраты реакции, но и большое число метасемитов, которые оказывают активизирующее или ингибирующее влияние. Во многих случаях кривая насыщения аллостерического фермента субстратом имеет вид гиперболы, однако в присутствии аллостерического эффектора она превращается в S-образную кривую.

Встречается и обратная ситуация, когда S-образная кривая в присутствии аллостерического эффектора превращается в гиперболу. Например, пируваткиназа скелетных мышц характеризуется кинетикой Михаэлиса, но в присутствии аллостерического ингибитора (фенилаланина) кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата становится S-образной, при этом сродство фермента к субстрату (фосфоенолпирувату) уменьшается. Изменение кинетических свойств под действием аллостерических эффекторов обусловлено конформационной перестройкой молекулы белка. С помощью сшивающих реагентов или каких-либо других воздействий на структуру белка можно наблюдать потерю чувствительности фермента к аллостерическим эффекторам. Для выявления аллостерических свойств иногда необходимо изменить условия определения активности: сместить pH реакционной среды в кислую или щелочную область от pH-оптимума или исследовать влияние эффектора при ненасыщенной концентрации субстрата.

Определение кинетических параметров (K_m и V) для ферментов с S-образной кинетикой затруднено, так как кривые не линеаризуются в двойных обратных координатах. В случае положительной кооперативности кривые загибаются вверх, а при отрицательной — вниз. Экстраполяция прямого участка кривой до пересечения с осью абсцисс позволяет определить концентрацию субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной. Эту величину принято обозначать $S_{0,5}$. Для описания зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в случае аллостерических ферментов применяют преобразованное уравнение Хилла:

$$\frac{v}{V} = \frac{[S]_0^{n_H}}{[S]_{0,5}^{n_H} + [S]_0^{n_H}},$$

в котором n_H — коэффициент Хилла. Сигмоидный характер кинетической кривой аллостерического фермента объясняют кооперативным взаимодействием между связывающими участками белка. Из уравнения Хилла видно, что величина $S_{0,5}$ неэквивалентна K_m . При $n_H = 1$ (в отсутствие кооперативности) $K_m = [S]_{0,5}$, когда $n_H \neq 1$, то $K_m = [S]_{0,5}^{n_H}$.

Исходя из логарифмической формы уравнения Хилла

$$\lg \frac{v}{V-v} = n_H \lg [S]_0 - n_H \lg [S]_{0,5},$$

зависимость в координатах $\lg v/V - v$ от $\lg [S]$ представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен n_H . При определении параметра n_H обычно не получают целого числа. Это объясняется тем, что коэффициент Хилла указывает не на общее число имеющихся на белке связывающих центров, а на число взаимодействующих центров, поэтому величину n_H называют коэффициентом взаимодействия. Определение его важно для обнаружения аллостерических свойств фермента и характеристики степени взаимодействия связывающих центров.

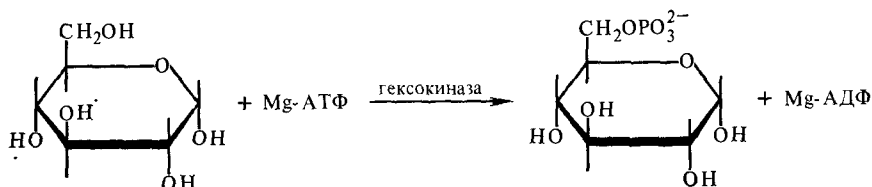
1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1982. 3-е изд. Т. 1, 2, 3.
2. Скоупс Р. Методы очистки белков. М., 1985.
3. Методы практической биохимии/Под ред. К. Уилсона, Б. Уильямса. М., 1978.
4. Номенклатура ферментов. М., 1979.
5. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980.
6. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., 1979.
7. Доис Э. Количественные проблемы биохимии. М., 1983.
8. Петушкова Е. В. Введение в кинетику ферментативных реакций. М., 1972.
9. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., 1966.
10. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М., 1978.
11. Северин Е. С., Курочкин С. Н., Кочетков С. Н. Изучение ферментов методом химической модификации//Усп. биол. хим. М., 1974. Т. 25. С. 65.
12. Kitz R., Wilson L. B. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase//J. Biol. Chem. 1962. Vol. 237. P. 3245.

III. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

1. ГЕКСОКИНАЗА

(АТФ: *D*-гексоза-6-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1)

Гексокиназа катализирует перенос фосфорильного остатка АТФ на α -*D*-глюкозу с образованием α -*D*-глюкозо-6-фосфата; реакция



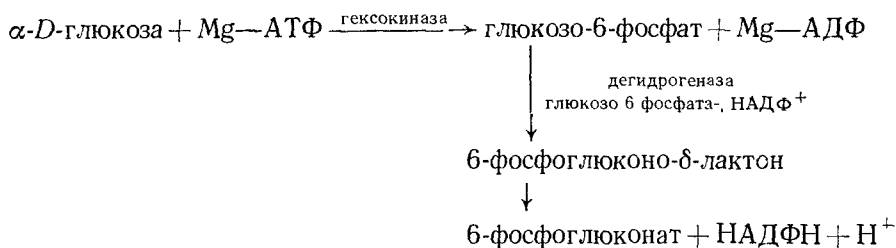
практически необратима ($\Delta G^{0'} = -4,0$ ккал/моль).

В метаболизме глюкозы дрожжевых клеток участвуют два изоэима гексокиназы. Изоэимы I и II имеют одинаковую молекулярную массу — 102 000 Да, состоят из двух субъединиц с молекулярной массой 52 000 Да каждая. В качестве субстрата реакции дрожжевая гексокиназа способна использовать не только α -*D*-глюкозу, но и α -*D*-маннозу и α -*D*-фруктозу. Димеры гексокиназы могут диссоциировать на активные мономеры. При низкой концентрации белка, высокой ионной силе, а также в присутствии субстратов равновесие димер $\rightleftharpoons$ мономер сдвигается в сторону мономера. Считают, что главную роль в метаболизме углеводов дрожжей играет изоэим II. В регуляции его активности принимает участие нуклеотидный субстрат. При постоянной концентрации ионов Mg^{2+} и высокой концентрации АТФ наблюдается ингибирование фермента, при этом уменьшается максимальная скорость реакции и увеличивается константа Михаэлиса для Mg-АТФ . рН-Оптимум активности фермента при рН 7,5. Константа Михаэлиса для α -*D*-глюкозы — 10^{-4} М.

Определение активности гексокиназы

Активность гексокиназы определяют энзиматическим методом. В качестве сопрягающего фермента в реакционную среду добавляют дегидрогеназу глюкозо-6-фосфата и НАДФ. Ферментативную реакцию

регистрируют по нарастанию оптической плотности при 340 нм (см. с. 7).



Реактивы:

1. Трис-НСl — 40 мМ раствор, рН 7,5.
2. α -D-глюкоза — 0,3 М раствор.
3. MgCl_2 — 0,2 М раствор.
4. АТФ — 15 мМ раствор, рН 7,5.
5. НАДФ⁺ — 18 мМ раствор, рН 6,5.
6. Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата (кристаллический препарат).
7. Гексокиназа.

Ферменты разводят на трис-НСl буфере непосредственно перед определением ферментативной активности. Растворы ферментов, АТФ, НАДФ до внесения в реакцию смесь хранят на льду.

В спектрофотометрическую кювету вносят следующие компоненты реакционной среды (указаны конечные концентрации): 30 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5, 10 мМ глюкозу, 15 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ АТФ, 0,6 мМ НАДФ⁺, 2 ед/мл дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата. Преинкубируют 3—5 мин, после чего начинают реакцию добавлением фермента (или субстрата) в объеме 20—30 мкл.

Определение белка. Для определения белка используют метод Лоури (с. 81). При спектрофотометрическом измерении определяют оптическую плотность при 280 нм и рассчитывают концентрацию с помощью коэффициента $A_{1\text{см}}^{1\%} = 9,0$.

Выделение гексокиназы из пекарских дрожжей

Реактивы:

1. Пекарские дрожжи — 1 кг.
2. Фосфатный буфер, рН 7,0 (ионная сила 0,1).
Состав буфера: KH_2PO_4 — 2,8 г; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 4,6 г; D-(+)-глюкоза — 5 г; ЭДТА — 0,37 г; H_2O — до 1 л.
3. Ацетатный буфер 0,02 М, рН 5,0 (ионная сила — 0,013). Состав буфера: CH_3COOH ледяная — 0,4 мл; CH_3COONa (безводный) — 1,1 г; D-(+)-глюкоза — 5 г; ЭДТА — 0,37 г; H_2O до 1 л.
4. Ацетатный буфер, рН 4,5 (ионная сила 0,05).
Состав буфера: CH_3COOH ледяная — 4,3 мл; CH_3COONa (безводный) — 4,3 г; D-(+)-глюкоза — 5 г; ЭДТА — 0,37 г; H_2O до 1 л.
5. D-(+)-глюкоза.
6. ЭДТА.

7. Na_2HPO_4 — 0,2 М раствор, приготовленный на 1 мМ ЭДТА.
8. CH_3COOH — 3 н. раствор.
9. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — сухой порошок, перекристаллизованный из раствора ЭДТА (1,5 г на 1 л).
10. ДЭАЭ-целлюлоза.
11. КМ-целлюлоза.
12. KCl — 0,3 М раствор.
13. NaCl — 0,4 М раствор.

Высушивание дрожжей и экстракция. Пекарские дрожжи высушивают при комнатной температуре. Из 1 кг дрожжей получают 200 г сухого порошка. Высушенные дрожжи измельчают в ступке и 100 г порошка суспендируют в 400 мл 0,2 М Na_2HPO_4 , содержащего 1 мМ ЭДТА, смесь инкубируют 3 ч при 37° С, после чего центрифугируют при 0° С 30 мин (5000 g).

pH-Осаждение. Супернатант помещают в ледяную баню и добавляют небольшими порциями 3 н. CH_3COOH при постоянном перемешивании, pH раствора доводят до 4,5 (эту процедуру проводят в течение 1,5—2 ч). Раствор оставляют при 4° С на ночь. На следующий день центрифугируют 20 мин при 10 000 g.

Фракционирование сульфатом аммония. Супернатант, полученный на предыдущей стадии, доводят сухим сульфатом аммония до насыщения 0,39 (24 г на 10 мл). Через час центрифугируют, осадок отбрасывают. В супернатанте увеличивают насыщение до 0,55 (10 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 100 мл). Раствор центрифугируют 30 мин при 15 000 g. Осадок растворяют в 20 мл фосфатного буфера pH 7,0, и полученный раствор ставят на диализ против 1 л того же буфера. Во время диализа буфер меняют 2—3 раза. Осадок, выпавший во время диализа, удаляют.

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. ДЭАЭ-целлюлозу готовят в соответствии с инструкцией (с. 109), заполняют колонку (3×25 см) и уравнивают буфером (реактив № 2). Наносят раствор белка и проводят элюцию в линейном градиенте того же буфера, содержащего 0—0,3 М KCl . Скорость элюции — 90 мл/ч. Собирают фракции по 9 мл, определяют в них содержание белка и ферментативную активность. Фракции, в которых обнаружена активность гексокиназы, объединяют и проводят повторную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. Для этого подготавливают колонку размером 1,4×15 см. Белок элюируют буфером (реактив 2) (около 200 мл), содержащим 0—0,3 М KCl . Скорость элюции — 35 мл/ч. Собирают фракции по 4 мл, в которых определяют содержание белка и активность гексокиназы, отбирают фракции с наибольшей активностью. На этой стадии можно закончить очистку фермента. Полученный раствор белка содержит два различных изозима дрожжевой гексокиназы. Белок можно осадить сульфатом аммония (насыщение 0,55), после чего поставить на диализ и высушить лиофилизацией.

Для разделения двух изозимов следует провести дополнительное фракционирование белка с использованием хроматографии на КМ-целлюлозе и повторно — на ДЭАЭ-целлюлозе.

Хроматография на КМ-целлюлозе. Соединяют фракции, обладающие ферментативной активностью, концентрируют с помощью ультрафильтрации диализуют против ацетатного буфера, pH 5,0 (реактив № 3).

КМ-целлюлозу подготавливают в соответствии с инструкцией (с. 109). Колонку размером 1,4×15 см уравнивают тем же буфе-

ром. На колонку наслаивают раствор белка (очень осторожно, чтобы не повредить верхний слой). Когда раствор белка войдет в ионообменник, через колонку пропускают ацетатный буфер (реактив № 3) в количестве 1—2 объемов колонки для удаления несвязавшихся с КМ-целлюлозой белков. Затем пропускают буфер pH 5,0, содержащий 0—0,4 М NaCl. Скорость элюции — 20 мл/ч. Собирают фракции по 4 мл. Элюат концентрируют с помощью ультрафильтрации и ставят на диализ против буфера (реактив № 2).

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе; pH-градиентная элюция. На колонку размером 1,2×27 см, заполненную ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную фосфатным буфером (реактив № 2), наносят раствор белка. Элюцию проводят в градиенте pH, используя 150 мл буфера (реактив № 2) в смешивающем сосуде, и 150 мл буфера (реактив № 4) во втором сосуде. На колонку можно нанести примерно 10 мг белка. Скорость элюции — 20 мл/ч. Собирают фракции по 4 мл. В процессе хроматографии pH изменяется от 7,0 до 5,0. Первым (после выхода из колонки примерно 100 мл раствора) выходит изозим I и вслед за ним — белок, соответствующий изозиму II.

ЛИТЕРАТУРА

1. Colowick S. P. The Hexokinases. N. Y.//The Enzymes/Ed. P. D. Boyer. 3 rd edn. 1973. Vol. 9. P. 1.
2. Barnard E. A. Hexokinases from yeast. N. Y.//Methods in Enzymology/Ed. W. A. Wood. 1975. Vol. 42C. P. 6.
3. Purich D. et al. The Hexokinases: kinetic, physical and regulatory properties. N. Y.//Adv. Enzymology/Ed. A. Meyster. 1973. Vol. 39. P. 249.
4. Mereno F. et al. Hexokinase P II from *Saccharomyces cervisiae* is regulated by changes in the cytosolic Mg^{2+} -free ATP concentration//Eur. J. Biochem. 1986. Vol. 161 P. 565.
5. Maitra P., Hobo Z. Molecular properties of yeast Glucokinase//Mol. Cell Biochem. 1977. Vol. 18, N 1. P. 21.

2. ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗА

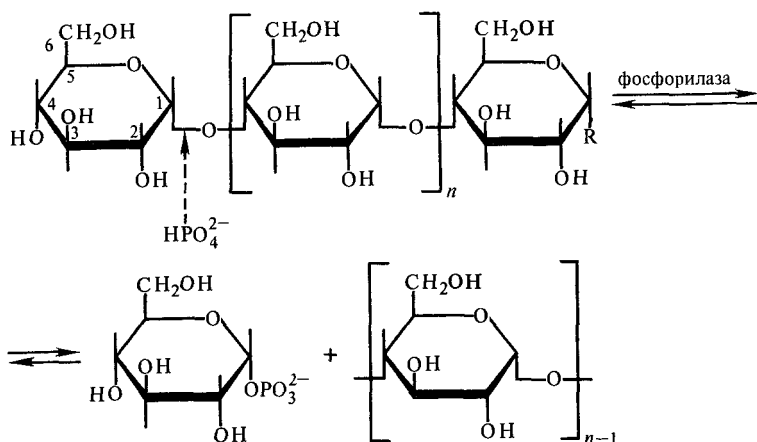
(α -1,4-глюкан: ортофосфат-глюкозил-трансфераза, КФ 2.4.1.1)

Гликогенфосфорилаза катализирует реакцию фосфоролитического расщепления α -1,4-гликозидной связи в молекуле гликогена, в результате которой отщепляется концевой нередуцирующий остаток глюкозы с образованием глюкозо-1-фосфата. Реакция обратима

$$(\Delta G^{\circ} = +0,73 \text{ ккал}).$$

В скелетной мускулатуре фосфорилаза находится в двух формах: *b* и *a*. Активность фосфорилазы *b* можно определить только в присутствии АМФ; фосфорилаза *a* активна в отсутствие АМФ. Для обеих форм фермента АМФ является положительным аллостерическим эффектором. Молекула фосфорилазы *b* представляет собой димер, фосфорилазы *a* — тетрамер. Молекулярная масса субъединицы фермента равна 97400 Да. Обе формы фермента могут находиться в состоянии равновесия между димерными и тетрамерными молекулами. На переход димеров в тетрамеры и обратно оказывают влияние компоненты ферментативной реакции, активаторы, ингибиторы, а также pH, ионная сила раствора, температура и др. Наиболее активными являются димеры обеих форм. Взаимопревращение фосфорилазы *b* и фосфорилазы *a* осуществляется ферментативно с помощью киназы фосфорила-

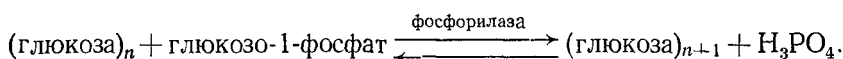
зы, катализирующей фосфорилирование одного остатка серина (сер-14) в каждой субъединице фосфорилазы *b* и фосфатазы фосфорилазы, дефосфорилирующей фосфорилазу *a*.



Величины $S_{0,5}$ фосфорилазы *a* и *b* для трех субстратов соответственно равны: для фосфата — 2 и 10 мМ, для глюкозо-1-фосфата — 2—3 и 4—6 мМ; для гликогена — 0,04 и 0,2 мМ; константа активации для АМФ: 0,002—0,005 мМ для фосфорилазы *a* и 0,05—0,2 мМ для фосфорилазы *b*. По отношению к ингибиторам известны следующие кинетические параметры: K_i для глюкозо-6-фосфата — 0,9—1,0 мМ (в случае фосфорилазы *b*) и 6,0 мМ (в случае фосфорилазы *a*); K_i для глюкозы — 2 мМ. Условия определения активности фермента: буфер, рН 6,8, инкубация при 30° С.

Определение активности фосфорилазы *b* и *a*

Определение активности фермента проводят по реакции синтеза гликогена:



Метод основан на измерении количества неорганического фосфора, образующегося в результате переноса остатка глюкозы от глюкозо-1-фосфата на гликоген.

Реактивы:

1. На-β-глицерофосфатный буфер — 60 мМ раствор, рН 6,8 (можно использовать имидазоновый или глицил-глициновый буфер), содержащий 20 мМ 2-меркаптоэтанол (добавляют перед использованием).
2. Гликоген — 2%-ный раствор.
3. Глюкозо-1-фосфат — 100 мМ раствор, рН 6,8.
4. АМФ — 0,05 М раствор, рН 7,0.
5. Фосфорилаза *b* (удельная активность 30—40 ед/мг).
6. Реактивы для определения неорганического фосфата (с. 33).
7. Реактивы для определения концентрации белка методом Лоури (с. 81).

В реакционную смесь (объем 1 мл) добавляют компоненты ферментативной реакции (указаны конечные концентрации) в следующей последовательности: буферный раствор (30 мМ), рН 6,8, содержащий 10 мМ 2-меркаптоэтанол, гликоген (1%), фосфорилазу (0,3 ед.), АМР — 1 мМ: преинкубируют 5 мин при 30° С, после чего реакцию начинают добавлением глюкозо-1-фосфата (25 мМ). В различные промежутки времени отбирают пробы (по 0,2 мл) для определения неорганического фосфата (с. 33). Контрольную пробу, в которую не добавляют АМФ, инкубируют в тех же условиях и используют для внесения поправки на присутствие следов фосфорилазы *a* в препарате фосфорилазы *b* и неорганического фосфата в реактивах.

Определение активности фосфорилазы *a* проводят в тех же условиях, но в реакционную смесь не добавляют АМФ.

Определение белка. Для определения концентрации белка методом Лоури необходимо предварительно осадить его трихлоруксусной кислотой (с. 81). Спектрофотометрическое измерение можно проводить при условии, когда из раствора фосфорилазы удален АМФ, при этом отношение A_{260}/A_{280} равно 0,52—0,55; для расчета используют коэффициент $A^{1\%}_{1\text{см}} = 13,2$ при 280 нм.

Выделение гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика

Реактивы:

1. ЭДТА — 0,15 мМ раствор, рН, 7,0.
2. CH_3COOH — 1 н. раствор.
3. KHCO_3 — сухой (перекристаллизованный).
4. $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ — насыщенный раствор, приготовленный при комнатной температуре из соли, перекристаллизованной в присутствии ЭДТА (рН раствора доводят аммиаком до 7,0).
5. Трис- HCl — 1 мМ раствор, рН 7,5.
6. Трис- HCl — 2 М раствор.
7. *L*-цистеин-0,3 М раствор, рН 6,8 (готовить перед употреблением). Вместо *L*-цистеина можно использовать 2-меркаптоэтанол.
8. Аммиак.
9. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1 М раствор.
10. АМФ — 0,1 М раствор, рН 7,0.
11. $\text{Na-}\beta$ -глицерофосфат — 60 мМ раствор, рН 6,8.

Растворы готовят на бидистиллированной воде. Экстракцию проводят при комнатной температуре; все остальные этапы работы можно проводить при комнатной температуре, используя сосуд со льдом, или в холодной комнате при 0—5° С.

Получение материала и экстракция. Кролика анестезируют введением в ушную вену раствора нембутала (60 мг/мл, 4—5 мл на кролика весом 3—4 кг). Через 5—10 мин вскрывают яремную вену и спускают кровь. Мышцы спины и задних конечностей быстро вырезают, помещают на охлажденную льдом фарфоровую чашку, освобождают от жира и сухожилий, измельчают в мясорубке, взвешивают и заливают равным объемом 0,15 мМ ЭДТА, рН 7,0. Тщательно перемешивают в течение 10 мин и отжимают через двойной слой марли. Экстракцию повторяют еще дважды, используя в начале равный объем и затем 0,5 объема раствора ЭДТА. Объединенный раствор фильтруют через стекловату и помещают в лед.

pH-осаждение. К экстракту медленно при перемешивании добавляют 1 н. CH_3COOH (охлажденную на льду) до pH 5,1—5,2. Через 5 мин помутневший раствор центрифугируют при 1300 g 45 мин при 3—4° С. Супернатант фильтруют через складчатый бумажный фильтр, осадок отбрасывают. Прозрачный супернатант доводят до pH 6,8 добавлением KHCO_3 (сухого).

Фракционирование сульфатом аммония. К раствору медленно, при перемешивании на магнитной мешалке добавляют насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0 (700 мл/л) до насыщения 41%. На следующий день осадок отделяют центрифугированием (10 000 об/мин). Супернатант отбрасывают, осадок растворяют в небольшом объеме 0,15 мМ раствора ЭДТА, pH 7,0 при 25° С. Раствор белка подвергают диализу в течение ночи против дважды сменяемого 1 мМ раствора трис-HCl, pH 7,5 (4—5 л).

Тепловая обработка. К полученному после диализа раствору белка (измеряют объем) добавляют: L-цистеин (или 2-меркаптоэтанол) до 0,03 М концентрации, ЭДТА — до 0,5 мМ и 2 М раствором триса доводят pH до 7,5. Инкубируют при 37° С в течение 30 мин в термостатированной бане, затем раствор охлаждают до 25° С и центрифугируют при комнатной температуре. Осадок отбрасывают, а pH супернатанта увеличивают до 8,2, добавлением 2 М раствора триса, инкубируют в тех же условиях. К охлажденному до 25° С белковому раствору добавляют 1 н. CH_3COOH до pH 7,0. В случае образования муты раствор центрифугируют, осадок отбрасывают.

Кристаллизация. Раствор белка охлаждают (можно использовать охлаждающую смесь: NaCl со льдом). К охлажденному до 0° С раствору добавляют АМФ и $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ до конечной концентрации, соответственно равной 0,001 и 0,01 М. Кристаллизация фосфоорилазы *b* начинается через 15—20 мин (иногда через 1—2 ч). Для более полной кристаллизации раствор фермента оставляют на ночь при 0—4° С. На следующий день суспензию центрифугируют (15000 g, 15—20 мин при 0—4° С), осадок растворяют в 30 мМ Na-β-глицерофосфате, pH 6,8, содержащем 30 мМ L-цистеин (или 2-меркаптоэтанол) при 30° С. Нерастворившийся белок отделяют центрифугированием и отбрасывают. К супернатанту вновь добавляют АМФ и $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ в той же концентрации.

Дальнейшая очистка фермента может проводиться путем еще 2—3 перекристаллизаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лисовская Н. П., Ливанова Н. Б. Регуляция действия мышечных фосфоорилаз//Аллостерические ферменты/Под ред. В. Л. Кретьевича. М., 1975. Т. 8. С. 110.
2. Graves D. J., Wang J. A-Glucan Phosphorylases-chemical and physical basis of catalysis and regulation, N. Y./The Enzymes/Eds. P. Boyer, H. Lardy. K. Myrback. 1972. Vol. 7. P. 435.
3. Dombradi V. Structural aspects of the catalytic and regulatory function of Glycogen Phosphorylase//Int. J. Biochem. 1981. Vol. 13. P. 125.
4. Вульфсон П. Л. Гликогенфосфоорилаза скелетных мышц//Биохимия 1986. Т. 51. Вып. 12. С. 1974.

3. КИНАЗА ФОСФОРИЛАЗЫ

(АТФ-фосфоорилаза *b* фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.38)

Киназа фосфоорилазы катализирует фосфоорирование фосфоорилазы *b*, превращая ее в более активную форму — фосфоорилазу *a*:
фосфоорилаза *b* + $\text{Mg-ATP} \rightleftharpoons$ фосфоорилаза *a* + Mg-ADP .

Молекула киназы фосфорилазы состоит из субъединиц четырех типов: $\alpha\beta\gamma\delta$. Молекулярная масса фермента — $1,3 \cdot 10^6$ Да — отвечает формуле $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$. Киназа фосфорилазы играет, как показано, ключевую роль в регуляции обмена гликогена и в сопряжении гликогенолиза и мышечного сокращения. В скелетной мускулатуре она существует в двух молекулярных формах: нефосфорилированной («неактивированная») и фосфорилированной («активированная»). Первая активна лишь при pH 8,2, вторая — при pH 6,8 и 8,2. При активации фермента отношение активностей, измеренных при pH 6,8/8,2, возрастает от 0,05 до 0,9—1,0. Активация киназы достигается фосфорилированием α - и β -субъединиц, которое катализирует цАМФ-зависимая протеинкиназа. Каталитическую роль выполняет γ -субъединица; δ -субъединица идентична Ca^{2+} -связывающему белку — кальмодулину. Ферментативная активность киназы фосфорилазы полностью зависит от ионов Ca^{2+} . На β -субъединице фермента имеется регуляторный центр, обладающий высоким сродством к АДФ. Константа Михаэлиса для АТФ равна 0,4 мМ.

В настоящей работе предлагается выделить частично очищенный препарат киназы фосфорилазы, с помощью которого можно получить фосфорилазу *a* из фосфорилазы *b*.

Определение активности киназы фосфорилазы

Метод основан на определении образующейся в процессе реакции фосфорилазы *a*, для измерения количества которой можно использовать два варианта. В первом варианте на второй стадии реакции проводят определение активности фосфорилазы *a*. Во втором варианте определяют количество радиоактивного ^{32}P , включенного в молекулу фосфорилазы от $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ АТФ. Ниже приводится описание обоих вариантов.

Реактивы:

1. Буфер для разведения фермента: Na- β -глицерофосфат 50 мМ, pH 7,0 содержащий 0,1% 2-меркаптоэтанол (буфер А).
2. Фосфорилаза *b*. Кристаллическую суспензию центрифугируют, осадок растворяют в буфере А, содержащем 2 мМ ЭДТА, при 30° С. Концентрация белка 30—50 мг/мл. Из раствора фосфорилазы *b* удаляют АМФ, пропуская его через колонку, заполненную смесью активированного угля (Norit А) и целлюлозы (1:1). Для освобождения белка от АМФ можно использовать другие способы: диализ, гель-фильтрацию через сефадекс G-25 (средний). После удаления АМФ отношение $A_{260/280}$ нм должно быть равным 0,53—0,56. Концентрацию фосфорилазы *b* определяют спектрофотометрически (с. 221). В отсутствие АМФ раствор белка может храниться при 0° С в течение нескольких недель.
3. Буфер для определения активности: 0,125 М трис-0,125 М Na- β -глицерофосфат, pH 8,6 (доводят 6 н. HCl).
4. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 60 мМ — 18 мМ АТФ раствор, pH 7,0.
5. Малеат-Na-0,1 М раствор, pH 6,6 содержащий 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0,2%-ный 2-меркаптоэтанол (добавляют перед использованием).
6. CaCl_2 — 0,1 М раствор.

7. Малееатный буфер — 0,1 М раствор, рН 6,5, содержащий глюкозо-1-фосфат (0,1 М) и 2%-ный гликоген.
8. Растворы для определения неорганического фосфата (с. 33).
9. Частично очищенный препарат киназы фосфорилазы.

Первый вариант

Киназная реакция. Реакционная смесь (в расчете на 1 мл) должна содержать следующие компоненты: 40 мМ трис — 40 мМ Na-β-глицерофосфатный буфер, рН 8,6, 5 мг фосфорилазы, 5—10 мкг частично очищенного препарата киназы фосфорилазы, 0,1 мМ CaCl₂. Инкубируют 3 мин при 30° С. Реакцию начинают внесением 10 мМ Mg²⁺ и 3 мМ АТФ. Конечное значение рН — 8,2. Реакция протекает в течение 5 мин при 30° С. Останавливают реакцию добавлением охлажденного малеатного буфера, рН 6,5. В контрольную пробу не добавляют киназу, чтобы внести поправку на присутствие следов фосфорилазы *a* в препарате фосфорилазы *b* и следов неорганического фосфата в используемых реактивах.

Определение активности образующейся фосфорилазы *a*. Активность фермента измеряют по обратной реакции (синтезу гликогена), сопровождающейся выделением неорганического фосфата. К малеатному буферу (0,1 М), рН 6,5, содержащему 0,1 М глюкозо-1-фосфат — 2%-ный гликоген, добавляют равный объем раствора, полученного после киназной реакции. Реакцию проводят 5 мин при 30° С. Останавливают реакцию добавлением реактивов для определения неорганического фосфата. Количество образовавшегося фосфата рассчитывают по калибровочному графику.

Концентрацию киназы фосфорилазы следует подобрать так, чтобы не более 20% добавленной фосфорилазы *b* превращалось в фосфорилазу *a* за 5 мин. Одна единица активности — это количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль фосфорилазы *b* в фосфорилазу *a* в 1 мин при 30° С, рН 8,2. Для расчета учитывают молекулярную массу субъединицы фосфорилазы, равную 97 400 Да; удельную активность фосфорилазы *a* в отсутствие АМФ принимают за 70% от активности фосфорилазы *b*, измеренной в присутствии АМФ.

Второй вариант

Киназная реакция. Реакционная смесь состоит из тех же компонентов, как в случае первого варианта, но вместо АТФ добавляют [γ -³²P] АТФ.

Определение количества фосфорилазы *a*. Из реакционной смеси отбирают аликвоты и помещают их на диски фильтровальной бумаги (ватман 3 ММ). Белок, нанесенный на фильтры, фиксируют 20%-ным раствором трихлоруксусной кислоты, после чего фильтры тщательно отмывают от не связанной с белком радиоактивной метки несколько раз сменяемым раствором 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем фильтры обрабатывают смесью абсолютного спирта и ацетона (1:1) и подсушивают в термостате при 70—80° С (или на воздухе). Сухие фильтры помещают во флаконы со сцинтилляционной жидкостью. Определение радиоактивности проводится методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии.

Получение частично очищенного препарата киназы фосфорилазы из скелетных мышц кролика

Реактивы:

1. ЭДТА — 4 мМ раствор — 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол (готовят перед употреблением), pH 7,0.
2. CH_3COOH — 1 н. раствор.
3. Na- β -глицерофосфат 100 мМ — 4 мМ ЭДТА — 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол (последний добавляют перед использованием), pH 8,2 (буфер А).
4. Na- β -глицерофосфат 50 мМ — 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол (добавляют перед использованием), pH 7,0 (буфер Б). Растворы готовят на бидистиллированной воде. Работу проводят при 0—5° С.

Получение экстракта. Измельченную мышечную ткань (получение см. на с. 221) взвешивают, заливают 2,5-кратным объемом 4 мМ ЭДТА — 0,1%-ным 2-меркаптоэтанолом, pH 7, и гомогенизируют 30 с при небольшой скорости. Гомогенат центрифугируют при 6000 g 45 мин; супернатант фильтруют через стекловату.

pH-Осаждение. Измеряют pH полученного супернатанта; pH должен быть не менее 6,7—6,8. К раствору добавляют 1 н. CH_3COOH (охлажденную) и доводят pH до 6,1—6,2. Через 15 мин помутневший раствор центрифугируют при 6000 g 45 мин. Супернатант отбрасывают; осадок суспендируют в буфере А (25 мл на 500 г мышц). Осадок диспергируют с помощью ручного гомогенизатора и затем разводят буфером Б до 70 мл.

Ультрацентрифугирование суспензии проводят при 78 000 g в течение 100 мин. Супернатант, содержащий киназу фосфорилазы, осторожно декантируют и фильтруют через стекловату.

4. ПОЛУЧЕНИЕ ФОСФОРИЛАЗЫ А

Фосфорилазу *a* получают из фосфорилазы *b*, освобожденной от АМФ (с. 223). Реакцию катализирует киназа фосфорилазы в присутствии Mg —АТФ.

Реактивы:

1. Na- β -глицерофосфатный буфер — 100 мМ раствор, pH 8,2, содержащий 100 мМ 2-меркаптоэтанол (добавляют перед использованием); pH буфера доводят 2 М трисом до 8,2.
2. Na- β -глицерофосфатный буфер — 50 мМ раствор, содержащий 50 мМ 2-меркаптоэтанол, pH 7,0.
3. Фосфорилаза *b* 30—50 мг/мл.
4. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 60 мМ — АТФ 18 мМ.
5. CH_3COOH — 1 н. раствор.
6. NaCl — 5 М раствор.

Растворы готовят на бидистиллированной воде.

В состав реакционной смеси в расчете на 1 мл входят: 50 мМ Na- β -глицерофосфатный буфер (pH 8,2), содержащий 50 мМ 2-меркаптоэтанол, 30—50 мг/мл фосфорилазы *b*, 0,1—0,2 мг киназы фосфорилазы. Реакцию начинают добавлением Mg^{2+} и АТФ до конечной концентрации 10 и 3 мМ соответственно. Инкубацию проводят 45 мин при 30° С, после чего смесь охлаждают на льду, доводят pH до 7,0 добавлением охлажденной 1 н. CH_3COOH . При охлаждении фосфорилаза *a* кристаллизуется. Для перекристаллизации осадок отделяют

центрифугированием, суспендируют в 50 мМ Na-β-глицерофосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 50 мМ 2-меркаптоэтанол; растворяют осадок добавлением 0,1 объема 5 М NaCl. Нерастворившийся белок удаляют центрифугированием. Супернатант ставят на диализ против того же буфера, но без NaCl. После удаления NaCl происходит кристаллизация фосфорилазы *α*. Для дополнительной очистки фермента повторяют перекристаллизацию еще 2—3 раза.

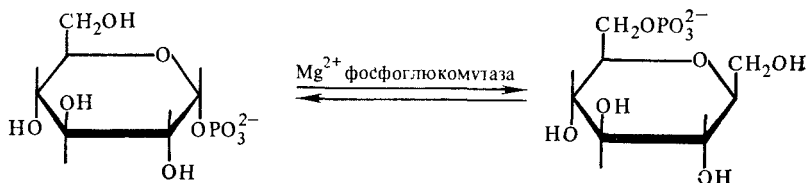
ЛИТЕРАТУРА

1. Вульфсон П. Л. Молекулярные свойства и регуляция ферментативной активности киназы фосфорилазы // Молекулярные основы действия ферментов / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Кочетова. М., 1985. С. 54.
2. Chan K.-F., Graves D. J. Molecular properties of Phosphorylase Kinase, N. Y. // Calcium and cell function / Ed. W. Y. Cheung. 1984. Vol. 5. P. 1.
3. Malencik D. A., Fischer E. H. Structure, function and regulation of Phosphorylase Kinase, N. Y. // Calcium and cell function / Ed. W. Y. Cheung. 1982. Vol. 3. P. 161.
4. Cohen P. Phosphorylase Kinase from rabbit skeletal muscle, N. Y. // Methods in Enzymology / Eds. S. P. Colowick, N. O. Kaplan. 1983. Vol. 99. P. 243.

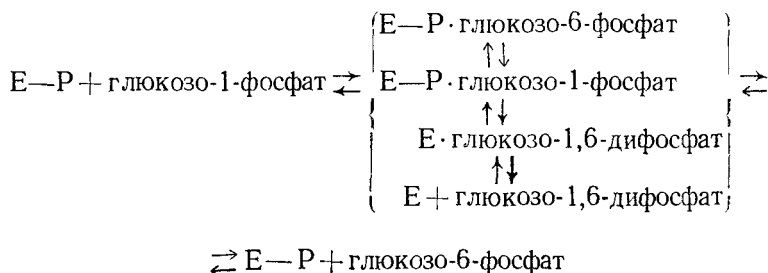
5. ФОСФОГЛЮКОМУТАЗА

(*α*-D-глюкозо-1,6-дифосфат: *α*-D-глюкозо-1-фосфат-фосфотрансфераза, КФ 2.7.5.1)

Фосфоглюкомутаза катализирует внутримолекулярный перенос фосфата между C₁ и C₆ в глюкозе. Равновесная смесь содержит 95% глюкозо-6-фосфата. Реакция осуществляется в присутствии иона Mg²⁺ и кофермента — глюкозо-1,6-дифосфата. Молекула фосфоглюкомутазы



из скелетных мышц кролика содержит одну полипептидную цепь с молекулярной массой 61 600 Да. Установлена полная последовательность всех 561 аминокислот, входящих в фермент. Фермент существует в двух формах: фосфорилированной и нефосфорилированной. Активной формой является фосфорилированная, образующаяся в качестве промежуточного продукта ферментативной реакции. Фосфорильная группа переносится от глюкозо-1,6-дифосфата на остаток серина-116, расположенный в активном центре фермента. В процессе катализа фермент выполняет роль донора и акцептора фосфата. Реакция, катализируемая фосфоглюкомутазой, протекает по следующей схеме:



Субстрат и продукт реакции образуют комплексы с фосфорилированной формой фермента (Е—Р), а кофермент — с нефосфорилированной (Е). При недостатке глюкозо-1,6-дифосфата происходит диссоциация комплекса с образованием неактивного фермента. Для осуществления каталитического цикла необходимо присутствие некоторого избытка глюкозо-1,6-дифосфата. Изолированный из мышц кролика фермент обычно является фосфорилированным, поэтому может катализировать реакцию и без добавления кофермента. Важную роль в каталитической реакции играют ионы Mg^{2+} , в отсутствие которых фермент вообще неактивен. Непосредственно в каталитическом акте Mg^{2+} не участвует, но, будучи связанным с фосфорильной группой фермента, оказывает влияние на равновесие реакции.

Кинетические параметры (измеренные по ферментативной активности) при варьировании концентрации глюкозо-1,6-дифосфата и глюкозо-1-фосфата зависят от соотношения концентраций этих компонентов. Величина K_m для глюкозо-1-фосфата изменяется от $2,4 \cdot 10^{-5}$ М до $4,8 \cdot 10^{-4}$ М; для глюкозо-1,6-дифосфата — от $8,3 \cdot 10^{-9}$ М до $7,6 \cdot 10^{-8}$ М. Кинетические параметры зависят также от того, находится ли фермент в активированном или неактивированном состоянии. Активацию фосфоглюкомутазы проводят путем предварительной инкубации в среде, содержащей ионы Mg^{2+} и имидазол (или гистидин).

Фосфоглюкомутаза обладает широкой субстратной специфичностью, но превращение изомерных форм α -D-глюкозы катализирует со значительно меньшей скоростью. В присутствии глюкозо-1,6-дифосфата фермент ингибируется фруктозо-1,6-дифосфатом и 2,3-дифосфоглицератом.

Определение активности фосфоглюкомутазы

Активность фосфоглюкомутазы может быть определена двумя методами: химическим, основанным на определении убыли субстрата реакции, и энзиматическим — в сопряженной системе, содержащей помимо фосфоглюкомутазы и глюкозо-1-фосфата также НАДФ и дегидрогеназу глюкозо-6-фосфата. Последний фермент используется в избытке, и скорость реакции, катализируемой фосфоглюкомутазой, определяют по нарастанию НАДФН.

Для определения активности (при любом методе) препарат фермента подготавливают для работы, активируя его в среде, содержащей 1 мМ $MgCl_2$ и 30 мМ гистидин (или имидазол). Смесь инкубируют 10—20 мин при 0° С. Предварительно растворы фосфоглюкомутазы и сопрягающего фермента (дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата) обессоливают на колонке с сефадексом G-25 (тонкий).

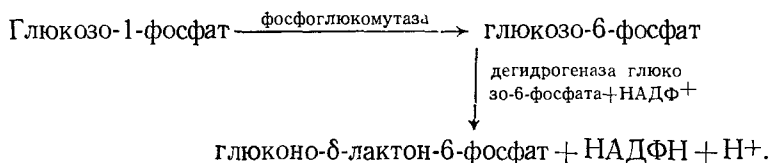
Химический метод

Реактивы:

1. Трис-HCl — 80 мМ раствор, pH 7,6.
2. Глюкозо-1-фосфат — 20 мМ раствор, pH 7,5.
3. Глюкозо-1,6-фосфат — 10 мкМ раствор.
4. $MgCl_2$ — 50 мМ раствор.
5. Фосфоглюкомутаза, активированная в присутствии 1 мМ Mg^{2+} и 30 мМ гистидина (или имидазола).
6. Реактивы для определения неорганического фосфата (с. 33).

В пробирки помещают реакционную смесь (объем 1 мл), состоящую из следующих компонентов (указаны конечные концентрации): 40 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5, 2 мМ глюкозо-1-фосфат, 1 мкМ глюкозо-1,6-дифосфат, 10 мМ $MgCl_2$ и 0,02 ед/мл фосfogлюкомутазы. Реакцию начинают добавлением фермента. Пробы инкубируют при 30° С. Активность определяют через каждые 30 с. Реакцию останавливают 1 н. H_2SO_4 . Кислотный гидролиз глюкозо-1-фосфата проводят, как указано на с. 39.

Энзиматический метод



Реактивы:

1. Трис-НСl — 48 мМ раствор, рН 7,5.
2. Глюкозо-1-фосфат — 60 мМ раствор, рН 7,5.
3. Глюкозо-1,6-дифосфат — 30 мкМ раствор.
4. $MgCl_2$ — 0,3 М раствор.
5. НАДФ — 6 мМ раствор, рН 6,5.
6. Фосfogлюкомутаза, активированная в присутствии 1 мМ Mg^{2+} , 30 мМ гистидина (или имидазола), рН 7,5.
7. Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата.

В спектрофотометрическую кювету объемом 3 мл помещают следующие компоненты (указаны конечные концентрации): 40 мМ трис-НСl буфер (рН 7,5), 2 мМ глюкозо-1-фосфат, 1 мкМ глюкозо-1,6-дифосфат, 0,2 мМ НАДФ, 10 мМ $MgCl_2$, 0,5 ед/мл дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата (в объеме 50 мкл) и 0,02 ед/мл (в объеме 50 мкл) фосfogлюкомутазы. Реакцию начинают добавлением фосfogлюкомутазы. Смесь перемешивают и регистрируют нарастание оптической плотности при 340 нм.

Определение белка. Для определения концентрации фосfogлюкомутазы используют метод Лоури (см. с. 81). При спектрофотометрическом измерении регистрируют оптическую плотность при 278 нм, учитывая, что $A_{1\%}^{1\text{см}} = 7,0$.

Выделение и очистка фосfogлюкомутазы из скелетных мышц кролика

Метод I

Реактивы:

1. CH_3COOH — 1 н. раствор.
2. $(NH_4)_2SO_4$ — сухой, перекристаллизованный из раствора ЭДТА (1,5 г на 1 л).
3. Ацетатный буфер — 0,15 М, рН 5,0.
4. $(NH_4)_2SO_4$, насыщение 0,32.
5. $(NH_4)_2SO_4$, насыщение 0,65, раствор приготовлен на 0,05 М ацетатном буфере, рН 5,0.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

Получение экстракта. К 200—300 г измельченной мышечной массе (приготовление см. на с. 221) добавляют равный объем охлажденной бидистиллированной воды, экстрагируют 2 мин на холоде и перемешивают. Фильтруют через ткань (или несколько слоев марли), после чего экстракцию повторяют равным объемом воды. Экстракты соединяют и доводят 1 н. CH_3COOH до pH 5,0.

Тепловая обработка. Мутный раствор подогревают на водяной бане (85—90°С) до тех пор, пока его температура достигнет 65°С, при этом раствор тщательно перемешивают. Затем нагревание прекращают, раствор помещают в сосуд с тающим льдом и охлаждают его до 40°С. Во время охлаждения раствор также перемешивают.

Фракционирование сульфатом аммония. К раствору, в котором на предыдущей стадии образуется осадок денатурированных белков, добавляют сухой мелко измельченный сульфат аммония до насыщения 0,2. После этого центрифугируют и осадок отбрасывают. В супернатанте добавлением сухой соли (маленькими порциями при осторожном перемешивании) увеличивают насыщение сульфата аммония до 0,65. Через 15—20 мин после насыщения раствор центрифугируют (30 мин, 15 000 g). Осадок осторожно, но тщательно суспензируют в 0,15 М растворе ацетатного буфера, pH 5,0 (добавляют объем буфера, приблизительно равный объему осадка).

Повторная тепловая обработка. Мутный раствор с насыщением сульфата аммония, равным 0,32, помещают в водяную баню, нагретую до 65°С. Раствор перемешивают, доводят его температуру до 63°С и продолжают нагревание при 63°С в течение 3 мин. Раствор охлаждают до 4°С; выпавший обильный осадок удаляют центрифугированием (15 мин, 10 000 g). В супернатанте определяют концентрацию белка и разводят его раствором сульфата аммония с насыщением 0,32 так, чтобы концентрация белка стала равной 3—5 мг/мл. Затем увеличивают насыщение до 0,5 медленным (по каплям) добавлением насыщенного раствора сульфата аммония, перемешивают. Оставляют в сосуде с тающим льдом на 30 мин, центрифугируют и осадок отбрасывают. Прозрачный супернатант снова помещают в термостатированную баню при 30°С на 30 мин. Осадок, выпавший при нагревании, также отбрасывают, центрифугируя со скоростью 10 000 g при комнатной температуре в течение 10 мин.

Кристаллизация. Супернатант помещают в лед, охлаждают до 1—3°С и очень медленно (в течение 2—2,5 ч) доводят насыщение до 0,55 насыщенным раствором сульфата аммония, осторожно перемешивая. Раствор сначала мутнеет, а через полчаса появляется характерная шелковистость. Для кристаллизации его оставляют на ночь. На следующий день с теми же предосторожностями увеличивают насыщение до 0,6 и опять оставляют на сутки для более полной кристаллизации.

Перекристаллизация. Суспензию центрифугируют (30 мин, 15 000 g, 4°С), кристаллический осадок растворяют в 0,15 М ацетатном буфере (pH 5,0) так, чтобы концентрация белка была равна 2—3 мг/мл. Раствор доводят до 0,5 насыщения, добавляя насыщенный раствор сульфата аммония, и нагревают 30 мин при 30°С. Осадок удаляют центрифугированием при комнатной температуре (20 мин, 10 000 g). Центрифугат охлаждают до 4°С и со всеми предосторожностями насыщение увеличивают до 0,6, добавляя насыщенный раствор сульфата аммония. Кристаллизация происходит в течение ночи при 4°С. Концентрацию сульфата аммония на следующий день увеличивают до 0,65. Перекристаллизацию повторяют 2—3 раза. По окончании этой проце-

дуры кристаллы собирают центрифугированием (30 мин, 15 000 g) и суспендируют в растворе сульфата аммония 0,65 насыщения, приготовленном на 0,15 M ацетатном буфере (pH 5,0). В этих условиях фермент стабилен и сохраняется при 4°C без потери активности в течение нескольких месяцев.

В качестве примеси в препарате фермента может быть альбумин крови. В случае загрязнения мышечной ткани кровью перед началом выделения можно промыть ткань физиологическим раствором.

Метод II

Реактивы:

1. К-фосфатный буфер — 30 mM, pH 7,0, содержащий 1 mM ЭДТА (раствор для экстракции).
2. CH_3COOH — 0,5 н. раствор.
3. NH_4OH — 1 н. раствор.
4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — (сухой, перекристаллизованный из 5 mM ЭДТА; pH 8,2; мелко измельченный).
5. Na_2HPO_4 — 1 mM раствор, pH 6,8, содержащий 0,1 mM ЭДТА.
6. Na_2HPO_4 — 1 mM раствор, pH 7,8, содержащий 0,1 mM ЭДТА.
7. Na_2HPO_4 — 1 mM раствор, pH 7,8, содержащий 0,1 mM ЭДТА и 0,2 M NaCl.
8. ДЭАЭ-целлюлоза.
9. $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{—HCl}$ — 0,1 M раствор, pH 7,0 (разводят 0,1 mM раствором ЭДТА, pH 7,0).
10. КМ-сефадекс.
11. Na_2HPO_4 — 50 mM раствор, pH 7,0, содержащий 0,1 mM ЭДТА и 1 mM Mg^{2+} . Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Работу проводят при 0—4°C.

Получение экстракта. Измельченную мышечную массу (с. 221) взвешивают и заливают двойным объемом раствора для экстракции. Гомогенизируют 30 с, отжимают через ткань. Мышечную массу повторно гомогенизируют в одном объеме раствора. Экстракты объединяют и центрифугируют 20 мин при 10 000 g.

pH-Осаждение. Супернатант доводят 0,5 н. CH_3COOH до pH 5,5. Выпавший осадок отделяют центрифугированием (10 мин, 20 000 g).

Тепловая обработка. В водяную баню, нагретую до 90°C, помещают раствор белка и при постоянном перемешивании доводят температуру раствора до 63°C, после этого сразу же помещают раствор белка в охлаждающую смесь (лед с солью), доводят его температуру до 4—6°, перемешивают. Осадок удаляют центрифугированием (10 мин, 20 000 g).

Фракционирование сульфатом аммония. Супернатант доводят аммиаком до pH 7,0 и медленно добавляют сухой сульфат аммония до 45%-ного насыщения. Перемешивают еще 30 мин и центрифугируют 20 мин при 20 000 g. Осадок отбрасывают. К супернатанту добавляют сульфат аммония до 75%-ного насыщения при постоянном перемешивании. Осадок, содержащий фосфоглюкомутазу, собирают центрифугированием и растворяют в 1 mM растворе Na_2HPO_4 , pH 6,8, содержащем 0,1 mM ЭДТА. Раствор диализуют в течение ночи против того же буфера. После диализа центрифугируют и супернатант разводят до концентрации белка 5—8 мг/мл; доводят pH раствором аммиака до 7,8.

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Прозрачный раствор белка

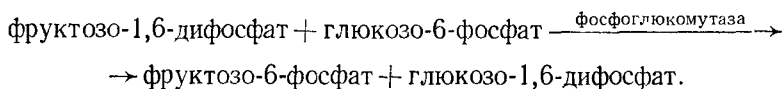
наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (5×70 см). Колонку предварительно уравнивают 1 мМ раствором Na_2HPO_4 , pH 7,8; содержащим 0,1 мМ ЭДТА и после нанесения белка промывают 1 л того же буфера. Для элюции используют градиент концентрации 0—0,2 М NaCl (2 л буфера без NaCl и 2 л буфера, содержащего 0,2 М NaCl). Фракции с одинаковой активностью объединяют и добавляют сульфат аммония до 75%-ного насыщения. Суспензию центрифугируют. Супернатант отбрасывают, а осадок растворяют в воде и диализуют в течение суток против 1 мМ Na_2HPO_4 , 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,0. После диализа центрифугируют.

Хроматография на КМ-сефадексе. Супернатант разводят до концентрации белка 5 мг/мл и наносят на колонку с КМ-сефадексом (2,5×50 см). Колонку предварительно уравнивают буфером (1 мМ Na_2HPO_4 , 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,0). После нанесения белка колонку промывают 500 мл того же буфера и элюируют в градиенте концентраций фосфатных буферных растворов (1 мМ и 33 мМ), содержащих 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,0. В элюате определяют концентрацию белка и ферментативную активность. Фракции, содержащие фосfogлюкомутазу, объединяют и белок концентрируют добавлением сульфата аммония до 75% насыщения. Суспензию центрифугируют. Осадок растворяют в 50 мМ растворе Na_2HPO_4 , pH 7,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и 1 мМ Mg^{2+} .

Гель-хроматография. Полученный раствор наносят на колонку с сефадексом $G=100$ (2,5×100 см). Уравнивание колонки и элюцию осуществляют тем же буфером. Фракцию фермента разливают на порции и хранят при -70°C .

Синтез глюкозо-1,6-дифосфата

Глюкозо-1,6-дифосфат может быть ферментативно синтезирован с помощью фосfogлюкомутазы в присутствии фруктозо-1,6-дифосфата. Фосfogлюкомутаза катализирует реакцию:



Концентрацию глюкозо-1,6-дифосфата определяют по количеству глюкозо-6-фосфата, измеряемому с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы или после щелочного гидролиза (15-минутное нагревание при 100°C в 0,2 н. растворе NaOH — см. с. 40).

Реактивы:

1. Трис- HCl — 50 мМ раствор, pH 7,6.
2. НАДФ — 6 мМ раствор, pH 6,5.
3. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,3 М раствор.
4. Фруктозо-1,6-дифосфат — 15 мМ раствор, pH 7,6.
5. Глюкозо-1-фосфат — 60 мМ раствор, pH 7,6.
6. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.
7. Фосfogлюкомутаза.
8. NaOH — 2 н. раствор.
9. Реактивы для определения неорганического фосфата (с. 33).

Составляют следующую реакционную смесь (указаны конечные концентрации): 40 мМ трис- HCl , pH 7,6; 0,2 мМ НАДФ; 10 мМ

$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 0,5 мМ фруктозо-1,6-дифосфат; 10 ед/мл фосфоглюкомутазы. Реакцию начинают добавлением 2 мМ глюкозо-1-фосфата. Инкубируют при 38°С в течение 10—15 мин. Останавливают реакцию нагреванием в течение 15 мин при 100°С. Белок удаляют центрифугированием. В супернатанте определяют количество образовавшегося глюкозо-1,6-дифосфата. Для этого глюкозо-1,6-дифосфат превращают в глюкозо-6-фосфат 10-минутным гидролизом в 0,1 н. растворе HCl при 100°С. Раствор нейтрализуют и определяют в нем глюкозо-6-фосфат с помощью дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата или после щелочного гидролиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ray W. J., Peck E. J. Phosphoglucumutase//The Enzymes/Ed. P. Boyer. N. Y., 1972 Vol. 6. P. 407.
2. Ray W. J., Hermodson M., Puvathingel J., Mohoney W. The complete amino acid sequence of rabbit muscle Phosphoglucumutase//J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258, N 15. P. 9166.
3. Joshi J. G., Lane R. Rabbit muscle phosphoglucumutase is a monomer//Biochem. Biophys. Res. Com. 1978. Vol. 85, N 2. P. 729.
4. Joshi J. G. Phosphoglucumutase from yeast//Methods in Enzymology. N. Y., 1982. Vol. 89. P. 599.
5. Possonneau J., Lowry O., Schulz D., Brown J. Glucose 1,6-diphosphate formation by phosphoglucumutase in mammalian tissues//J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244, N 4. P. 902.

6. ГЛЮКОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗА

(*D*-глюкозо-6-фосфат-кетол-изомераза, КФ 5.3.1.9)

Глюкозофосфатизомераза катализирует обратимую реакцию изомеризации, в которой глюкозо-6-фосфат (альдоза) превращается во фруктозо-6-фосфат (кетозу). Реакция легко протекает в обоих направлениях, так как изменение свободной стандартной энергии невелико ($\Delta G^{0'} = +0,4$ ккал/моль).



Глюкозофосфатизомераза является димером с молекулярной массой 132 000 Да; состоит из двух идентичных субъединиц. После обработки 6 М гуанидин- HCl молекула диссоциирует на субъединицы с молекулярной массой 62 000 Да. Фермент обладает высокой специфичностью по отношению к *D*-глюкозо-6-фосфату ($K_m=0,12$ мМ) и *D*-фруктозо-6-фосфату ($K_m=0,07$ мМ при 30°С, рН 8,2), не катализирует изомеризацию других фосфосахаров.

В тканях млекопитающих глюкозофосфатизомераза существует в виде одного изоформа. Множество обладающих активностью полос, наблюдаемых при электрофорезе, является следствием его нестабильности. При хранении в растворе, содержащем ЭДТА и 2-меркаптоэтанол (или дитиотреитол), структура фермента стабилизируется. Для проявления ферментативной активности фосфоглюкозоизомераза не требует каких-

либо активаторов или кофакторов. рН-Оптимум активности ее наблюдается в области рН 8,0—8,5. Фермент конкурентно ингибируется 6-фосфоглюконатом ($K_i=0,06$ мМ), эритрозо-4-фосфатом, рибозо-5-фосфатом и в меньшей степени другими фосфосахарами.

Определение активности глюкозофосфатизомеразы

Активность глюкозофосфатизомеразы может быть определена двумя методами: химическим — по измерению образующегося в прямой реакции фруктозо-6-фосфата (количество фруктозо-6-фосфата определяют по фруктозе) и энзиматическим — по измерению образующегося глюкозо-6-фосфата в обратной реакции (количество глюкозо-6-фосфата определяют в сопряженной системе с помощью дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата). Скорость ферментативной реакции регистрируют спектрофотометрически по нарастанию НАДФН (см. с. 7).

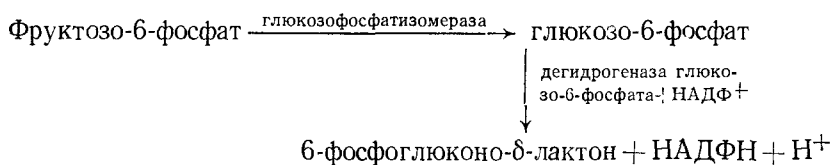
Химический метод

Реактивы:

1. Трис-НСl — 0,5 М раствор, рН 8,3.
2. Глюкозо-6-фосфат — Na_2 -соль, 0,1 М раствор.
3. HCl — 8 н. раствор.
4. NaOH — 0,1 н. раствор.
5. Фосфоглюкозоизомераза.
6. Реактивы для определения фруктозы (с. 41).

Раствор субстрата (глюкозо-6-фосфата) предварительно разводят до концентрации 20 мМ (к 2 мл глюкозо-6-фосфата добавляют 1 мл 0,5 М раствора триса, объем доводят до 10 мл водой, рН 8,3). Реакционная смесь в 1 мл содержит: 50 мМ трис, рН 8,3, 4 мМ глюкозо-6-фосфат. Пробы инкубируют 1—2 мин при 37°C, после чего реакцию начинают добавлением глюкозофосфатизомеразы (в объеме 25—50 мкл). Останавливают реакцию добавлением 8 н. HCl. Контрольную пробу инкубируют без фермента. Ферментативную реакцию измеряют в различные промежутки времени с интервалом 30 с.

Энзиматический метод



Реактивы:

1. Триэтаноламин — 55 мМ раствор, рН 8,3.
2. ЭДТА — 3 мМ раствор, рН 8,3.
3. Фруктозо-6-фосфат — Na_2 -соль 0,12 М раствор, рН 8,3.
4. НАДФ — 15 мМ раствор, рН 6,5.
5. Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата.
6. Глюкозофосфатизомераза.

В спектрофотометрическую кювету вносят следующие компоненты реакции (указаны конечные концентрации): 50 мМ триэтаноламин,

pH 8,3, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ фруктозо-6-фосфат, 0,5 мМ НАДФ, 1 ед/мл дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата. Преинкубируют 5 мин. Во время преинкубации присутствующий в препарате фруктозо-6-фосфата в качестве примеси глюкозо-6-фосфат окисляется. Только после этого начинают реакцию добавлением глюкозофосфатизомеры (в объеме 25—30 мкл), разведенной 10 мМ триэтаноламином, содержащим 1 мМ ЭДТА, pH 8,3.

Определение белка. Для определения белка используют микробиуретовый метод (см. с. 81). В случае спектрофотометрического определения концентрацию белка рассчитывают с учетом коэффициента поглощения $A_{1\%}^{1\text{см}} = 13,2$ при 280 нм.

Примечание. Если в препарате дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата имеется примесь дегидрогеназы-6-фосфоглюконата, при энзиматическом методе определения активности фосфоглюкозоизомеразы образуется 6-фосфоглюконат — конкурентный ингибитор фермента. Учитывая количество образовавшегося 6-фосфоглюконата, вносят поправку при расчете активности фосфоглюкозоизомеразы.

Выделение и очистка глюкозофосфатизомеразы из скелетных мышц кролика

Метод I

Реактивы:

1. KCl — 0,01 М раствор, приготовленный на 1,5 мМ растворе ЭДТА, pH 7,0 (раствор для экстракции).
2. $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ — 1 М раствор.
3. NaOH — 1 н. раствор.
4. Цитрат аммония — 0,25 М раствор, pH 8,5.
5. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — сухой, перекристаллизованный из 5 мМ раствора ЭДТА при pH 8,2.
6. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,1 М раствор.
7. NH_4OH — 0,5 н. раствор.
8. ЭДТА — 0,025 М раствор, pH 8,0.
9. Этиловый спирт.
10. Ацетон.
11. CH_3COOH — 0,2 н. раствор.
12. Бентонит.
13. Трис-HCl — 0,2 М раствор, pH 8,0.
14. NaHPO_4 — 0,1 М раствор.
15. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — насыщенный раствор.

Растворы готовят на бидистиллированной воде. Работу при выделении фермента проводят в холодной комнате.

Получение экстракта. Измельченную мышечную массу (с. 221) взвешивают и гомогенизируют 1 мин в двойном объеме раствора для экстракции. Второй раз гомогенизируют в равном по весу объеме того же раствора. Перемешивают гомогенат еще 15 мин на механической мешалке, после чего центрифугируют 15 мин при 15 000 g. Объем этой фракции считают равным объему добавленного KCl (*фракция 1*).

Фракционирование ацетатом цинка. Добавляют 1,0 М ацетат цинка до конечной концентрации 0,03 М и доводят pH до 8,5, добавляя 1 н. раствор NaOH, предварительно охлажденный до 0°С. Через 1—2 ч плотную белую суспензию центрифугируют (15 мин, 15 000 g). Осадок суспендируют в 0,25 М цитрате аммония, pH 8,5 (добавляют 1/5 часть

объема от фракции 1) и оставляют на ночь. На следующий день осадок удаляют центрифугированием (30 мин, 15 000 g). Промывают осадок 0,25 М цитратом аммония, pH 8,5 (используют 1/15 часть объема фракции 1). Оба раствора соединяют. Получают слегка мутный красный раствор (фракция 2).

Фракционирование сульфатом аммония. Фракцию 2 доводят сухим сульфатом аммония до насыщения 0,33. Осадок удаляют центрифугированием (20 мин, 15 000 g). Насыщение сульфата аммония в супернатанте увеличивают до 0,63; затем центрифугируют (30 мин, 15 000 g) и осадок растворяют в 0,025 М ЭДТА pH 8,0 (в 1/8 части объема фракции 2), раствор диализуют против 0,005 М ацетата магния в течение ночи. Нерастворившийся осадок удаляют. Получают прозрачный раствор (фракция 3).

Фракционирование спиртом. Определяют содержание белка во фракции 3 и разводят ее 0,005 М раствором ацетата магния так, чтобы концентрация белка была равна 15 мг/мл. Доводят pH раствора до 8,6 охлажденным 0,5 н. раствором аммиака. После этого раствор белка помещают в баню при -10°C и добавляют небольшими порциями хорошо охлажденный 96%-ный этанол в таком количестве, чтобы конечная концентрация его была равна 34%. Температура раствора белка не должна превышать 0°C . Через 20 мин после добавления последней порции спирта раствор центрифугируют при -15°C 15 мин (15 000 g). Осадок отбрасывают, а в супернатанте увеличивают концентрацию спирта до 64%. Снова центрифугируют в тех же условиях, полученный осадок суспендируют в 0,1 М растворе ацетата магния в объеме, равном 1/4 части объема фракции 3, имеющей концентрацию белка около 15 мг/мл. Суспензию центрифугируют 20 мин при 15 000 g и получают прозрачный темно-желтый раствор (фракция 4).

Фракционирование ацетоном. Фракцию 4 обрабатывают ацетоном, добавляя такое его количество, чтобы конечная концентрация была равна 40%. Ацетон предварительно охлаждают до -10°C и вносят медленно, поддерживая температуру смеси около 0°C . Затем центрифугируют при -5°C 15 мин (15 000 g). Осадок отбрасывают, а в супернатанте увеличивают концентрацию ацетона до 50%. Через 10 мин снова центрифугируют в тех же условиях и полученный осадок растворяют в 0,05 М растворе ацетата магния, используя его в объеме, примерно равном 1/2 от объема фракции 4. Получают опалесцирующий светло-желтый раствор белка (фракция 5).

Фракционирование бентонитом. Определяют содержание белка во фракции 5 и затем разводят ее так, чтобы концентрация белка была равна 7 мг/мл. Для этого используют 0,05 М раствор ацетата магния, pH доводят до 7,4, добавляя охлажденный 0,2 н. раствор уксусной кислоты. Тщательно перемешивая раствор белка, вносят в него бентонит (4 г на 1 г белка). Перемешивание продолжается 10 мин, после чего адсорбент немедленно удаляют центрифугированием при 15 000 g в течение 30 мин. Получают светлый супернатант (фракция 6).

Концентрирование раствора белка ацетоном. После обработки бентонитом концентрируют раствор белка, медленно добавляя равный объем ацетона, охлажденного до -10°C (не допускают повышения температуры выше 0°C). Через 10 мин после добавления последней порции ацетона молочно-белый раствор центрифугируют (15 мин при 15 000 g). Небольшой осадок растворяют (в 1/200—1/100 части от объема фракции 6) в 0,2 М раствора триса (pH 8,0) и подвергают диализу в течение ночи против 1000-кратного объема 0,01 М раствора фосфата натрия, pH 7,0 (фракция 7).

Кристаллизация. К раствору белка, имеющему концентрацию 30 мг/мл (более низкая концентрация нежелательна), добавляют нейтрализованный насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 0,45, при этом значительно увеличивается вязкость раствора. Появившийся осадок немедленно удаляют центрифугированием (5 мин, 2000 g), после чего доводят насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 0,48—0,50. Появляется опалесценция, которая постепенно увеличивается, выпадают шелковистые нити. В последующие дни насыщение постепенно увеличивают не более чем на 0,1—0,2 в день. После получения конечного насыщения (0,8) весь активный белок кристаллизуется в течение двух дней. Для перекристаллизации суспензию кристаллов центрифугируют 1 ч при 20 000 g. Маточный раствор осторожно отсасывают, кристаллы растворяют в 0,1 М растворе фосфатного буфера, pH 7,0 (1/5—1/3 часть объема суспензии), постепенно добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до насыщения 0,8.

Метод II

Реактивы:

1. Триэтаноламин — 50 mM раствор, pH 8,2, содержащий 1 mM ЭДТА и 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол (раствор для экстракции).
2. Имидазол — 10 mM раствор, pH 6,6, содержащий 1 mM ЭДТА и 0,1%-ный меркаптоэтанол (буфер А).
3. Имидазол — 10 mM раствор, pH 7,2, содержащий 1 mM ЭДТА и 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол (буфер Б).
4. Имидазол — 10 mM раствор, содержащий 1 mM ЭДТА; 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол и 7 mM фруктозо-6-фосфат (или 3 mM глюкозо-6-фосфат), pH 7,2.
5. Триэтаноламин — 25 mM раствор, pH 8,2, содержащий 1 mM ЭДТА и 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол.
6. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — насыщенный раствор, приготовленный на 25 mM растворе триэтаноламина, содержащем 1 mM ЭДТА и 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол, pH 8,2.

Растворы готовят на бидистиллированной воде. Работу проводят в холодной комнате.

Получение экстракта. Мышечную массу (с. 221) взвешивают и гомогенизируют 1 мин в двойном объеме раствора для экстракции. Доводят pH гомогената до 6,6 и продолжают экстракцию при перемешивании на механической мешалке еще 30 мин. Центрифугируют 15 мин при 20 000 g. Супернатант фильтруют через стекловату и диализуют в течение ночи против буфера А.

Хроматография на фосфоцеллюлозе. Подготовленную для работы фосфоцеллюлозу (циклизацию проводят, как указано на с. 109) уравновешивают буфером А и добавляют к раствору белка (примерно 20 г сухой фосфоцеллюлозы на раствор белка, полученный из 200 г мышц). Смесь перемешивают 20 мин, затем переносят на воронку Бухнера и фильтруют под небольшим давлением. Фосфоцеллюлозу отмывают от несвязавшегося белка буфером А (примерно 5 л) до тех пор, пока оптическая плотность элюата при 280 нм будет равна 0,01. После этого фосфоцеллюлозу суспендируют в 1 л буфера Б и pH осторожно доводят до 7,2 NaOH. Этим же буфером вновь отмывают фосфоцеллюлозу от несвязавшихся белков (примерно 7 л).

Элюция фермента. Фосфоцеллюлозу помещают в колонку диаметром 7,5 см, высота слоя ионообменника — 8 см. Для элюции использу-

ют 350 мл 10 мМ имидазола, содержащего 0,1%-ный меркаптоэтанол и 3 мМ глюкозо-6-фосфат, рН 7,2. Глюкозофосфатизомераза элюируется буфером (100—150 мл), содержащим субстрат.

Кристаллизация. После аффинной элюции можно провести кристаллизацию фермента. Элюат, содержащий глюкозофосфатизомеразу, диализуют в течение ночи против насыщенного сульфата аммония, приготовленного на 25 мМ триэтаноламине, содержащем 1 мМ ЭДТА и 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол, рН 8,2. Осадок собирают центрифугированием и растворяют в том же буфере; разводят до концентрации белка 10 мг/мл. К раствору белка медленно на холоду добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до 48%-ного насыщения. Выпавший при этом аморфный осадок удаляют. Раствор белка оставляют на ночь при комнатной температуре для кристаллизации.

Примечание. Так как препараты фосфоцеллюлозы отличаются между собой, целесообразно предварительно установить количество ионообменника, необходимое для связывания фермента. Берут (в расчете на сухой вес) 5 г фосфоцеллюлозы, уравновешенной буфером А, и добавляют определенную порцию раствора белка. В элюате определяют активность глюкозофосфатизомеразы. Последующие порции белка добавляют до полного насыщения ионообменника ферментом. На основе этих данных рассчитывают количество фосфоцеллюлозы, требующееся для связывания всего фермента. Суспензию перемешивают 30—40 мин, после чего в элюате определяют ферментативную активность, чтобы убедиться в полноте адсорбции фермента.

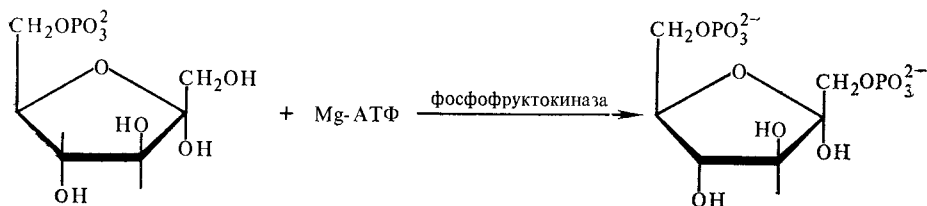
ЛИТЕРАТУРА

1. Gracy R. W. Glucosephosphate Isomerase from catfish muscle and liver and from mammalian tissues//Methods in Enzymology. 1982. Vol. 89. P. 550.
2. Phillips T., Talent J., Gracy R. Isolation of rabbit muscle Glucosephosphate Isomerase by a single step substrate elution//Biochem. Biophys. Acta. 1976. Vol. 429, N 2 P. 624.
3. Simon L. M., Kotorman M., Szajani B. et al. Preparation and characterization of immobilized glucosephosphate isomerase//Enzyme Microb. Technol. 1986. Vol. 8. N 4. P. 222.
4. Noltmann E. A. Phosphoglucose Isomerase rabbit muscle cristaline//Methods in Enzymology. 1966. Vol. 9. P. 557.
5. Dyson E., Noltmann E. A. The effect of pH and temperature on the kinetic parameters of phosphoglucose isomerase//J. Biol. Chem. 1968. Vol. 243, N 7. P. 1401.

7. ФОСФОФРУКТОКИНАЗА

(АТФ: *D*-фруктозо-6-фосфат-1-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.11)

Фосфофруктокиназа катализирует фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата с участием в качестве второго субстрата Mg—АТФ. Реакция практически необратима ($\Delta G^{\circ} = -3,4$ ккал/моль).



Фосфофруктокиназа — один из ключевых ферментов, регулирующих процесс гликолиза в целом. Активной формой фермента является тетрамер, состоящий из 4 субъединиц с молекулярной массой 83 000 Да каждая. В зависимости от условий тетрамеры могут превращаться в высокополимерные агрегаты или диссоциировать на неактивные димеры и мономеры. Фосфофруктокиназа является аллостерическим ферментом. К числу аллостерических эффекторов относятся субстраты (АТФ, фруктозо-6-фосфат) и продукты реакции (АДФ, фруктозо-1,6-дифосфат), а также такие метаболиты, как АМФ, цАМФ, цитрат, фруктозо-2,6-дифосфат, фосфокреатин, 3-фосфоглицерат, 2-фосфоглицерат, фосфоенолпируват, ионы NH_4^+ , K^+ , неорганический фосфат и др.

Среди указанных эффекторов наиболее важное значение для регуляции ферментативной активности имеют ингибиторы (АТФ, цитрат) и активаторы (фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, фруктозо-2,6-дифосфат, АМФ, цАМФ). На каждой субъединице фермента имеются каталитический и регуляторные центры для АТФ, а также для цитрата, АМФ, фруктозо-2,6-дифосфата. При высокой концентрации АТФ происходит связывание нуклеотида в регуляторном ингибиторном центре, при этом свободный АТФ связывается в 10 раз прочнее, чем Mg-ATP . Ингибирующее действие АТФ усиливается в присутствии цитрата и, наоборот, действие цитрата усиливается в присутствии АТФ. Вместе с тем АМФ, цАМФ и некоторые другие активаторы снижают ингибирующий эффект АТФ и цитрата.

Кооперативный характер действия аллостерических эффекторов более отчетливо выявляется при низких значениях рН (рН 7,0). Аллостерическое ингибирование АТФ сопровождается уменьшением сродства фермента к фруктозо-6-фосфату. Активатор фруктозо-2,6-дифосфат, обладающий высоким сродством к ферменту (константа диссоциации 0,8 мкМ), препятствует ингибированию АТФ и снижает константу Михаэлиса для фруктозо-6-фосфата. Зависимость степени кооперативности от концентрации субстрата (фруктозо-6-фосфата) наблюдается в присутствии как отрицательных (АТФ и цитрат), так и положительных эффекторов (АМФ, цАМФ, фруктозо-1,6-дифосфат, неорганический фосфат и др.). Молекула фосфофруктокиназы способна фосфорилироваться в присутствии цАМФ-зависимой протеинкиназы.

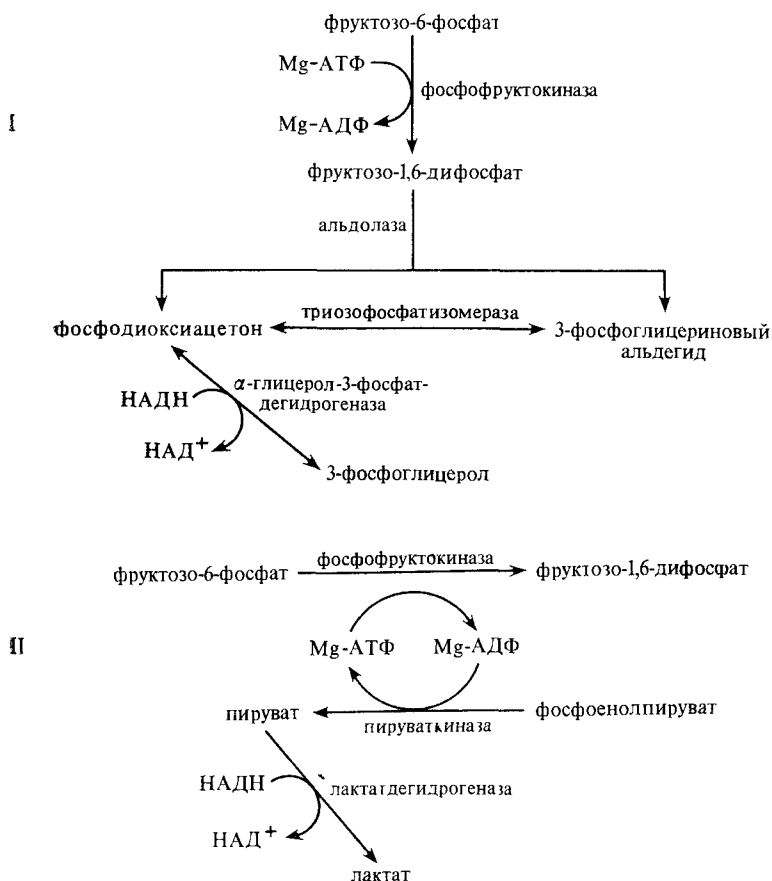
Фосфорилирование фермента не отражается на ферментативной активности при рН 8,0. Однако фосфорилирование белка оказывает влияние на аллостерические свойства фермента: повышается чувствительность к ингибированию АТФ и цитратом, но снижается чувствительность к активирующему действию АМФ и фруктозо-2,6-дифосфата. Предполагают, что фосфорилирование индуцирует конформационные изменения, способствующие смещению равновесия между двумя формами фермента: активной и неактивной. При связывании АТФ в ингибиторном центре также происходит смещение равновесия в сторону неактивной конформационной формы фосфофруктокиназы.

Кажущаяся величина константы Михаэлиса для субстратов (фруктозо-6-фосфата и АТФ) зависит от рН реакционной среды, в которой проводится определение ферментативной активности и от концентрации второго субстрата. В зависимости от условий эксперимента она может изменяться в широких пределах: для фруктозо-6-фосфата — от $2 \cdot 10^{-5}$ до $2 \cdot 10^{-4}$ М; для АТФ — от $7 \cdot 10^{-5}$ до $2 \cdot 10^{-4}$ М. Кажущаяся константа ингибирования фосфофруктокиназы для АТФ равна 0,4 мМ в присутствии 0,4 мМ фруктозо-6-фосфата (рН 7,1) или 3,1 мМ в присутствии 1 мМ фруктозо-6-фосфата (рН 7,4). Для цитрата кажущаяся

константа ингибирования равна 0,2 мМ в присутствии 0,3 мМ фруктозо-6-фосфата, 1 мМ АТФ при рН 7,0.

Определение активности фосфофруктокиназы

Активность фосфофруктокиназы можно измерить двумя методами: по скорости образования фруктозо-1,6-дифосфата (I) или АДФ (II). В обоих случаях количество продукта ферментативной реакции определяется по окислению НАДН.



Ниже приводится описание обоих методов измерения активности фосфофруктокиназы.

Реактивы:

1. Трис-НСI — 75 мМ раствор, рН 8,0.
2. ЭДТА — 3 мМ раствор.
3. $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ — 180 мМ раствор.
4. $(NH_4)_2SO_4$ — 120 мМ раствор.
5. Дитиотреитол — 30 мМ раствор.
6. Фруктозо-6-фосфат — 30 мМ раствор, рН 7,0.
7. АТФ — 30 мМ раствор, рН 7,0.
8. КСI — 1,5 М раствор.
9. НАДН — 6 мМ раствор, рН 7,5.
10. Na-β-глицерофосфат — 50 мМ раствор, рН 8,0.

11. Фосфоенолпируват — 9 мМ раствор, рН 7,7.

12. Альдолаза, триозофосфатизомераза и α -глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (по схеме I); пируваткиназа и лактатдегидрогеназа (по схеме II).

Кристаллический препарат фосфофруктокиназы растворяют в 50 мМ Na- β -глицерофосфате, содержащем 0,2 мМ ЭДТА, 0,2 мМ дититреитол и 0,1 мМ АТФ, рН 8,0; концентрация фермента 2—3 ед/мл. Вместо трис-HCl буфера, рН 8,0, можно использовать трис-фосфатный, глицилглицин-Na- β -глицерофосфатный, триэтаноламиновый буферные растворы.

Метод I

Для определения фруктозо-1,6-дифосфата реакционная смесь содержит систему сопрягающих ферментов, указанных на схеме I.

В спектрофотометрическую кювету вносят следующие компоненты ферментативной реакции (указаны конечные концентрации): 50 мМ трис-HCl, рН 8,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 4 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1 мМ фруктозо-6-фосфат, 1 мМ АТФ, 0,2 мМ НАДН, 50 мМ KCl, альдолаза (0,4 ед/мл), триозофосфатизомераза (2,5 ед/мл) и α -глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (0,4 ед/мл). Реакцию начинают добавлением фосфофруктокиназы. Измеряют уменьшение оптической плотности при 340 нм. Оптимизацию условий определения активности проводят, как указано на с. 208.

При расчете активности учитывают, что превращение каждого моля фруктозо-1,6-дифосфата сопровождается окислением 2 моль НАДН. Коэффициент молярного поглощения НАДН см. на с. 7.

Для определения количества образующегося фруктозо-1,6-фосфата вместо α -глицерол-3-фосфатдегидрогеназы может быть использована дегидрогеназа 3-фосфоглицеринового альдегида. В этом случае активность фосфофруктокиназы измеряют по скорости восстановления НАД^+ (см. определение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на с. 253).

Определение концентрации белка проводят методом Лоури (с. 81). При спектрофотометрическом определении для расчета используют коэффициент $A_{1\%}^{1\text{см}} = 10,2$ при 280 нм.

Метод II

Для определения количества АДФ (второго продукта фосфофруктокиназной реакции) реакционная смесь содержит сопрягающие ферменты, указанные на схеме II.

В спектрофотометрическую кювету вносят следующие компоненты (указаны конечные концентрации): 50 мМ трис-HCl, рН 8,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 6 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 50 мМ KCl, 4 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 мМ НАДН, 1 мМ фруктозо-6-фосфат, 1 мМ АТФ, 0,3 мМ фосфоенолпируват, пируваткиназу (2 ед/мл) и лактатдегидрогеназу (2 ед/мл). Реакцию начинают добавлением фосфофруктокиназы (0,005—0,015 ед/мл). Измеряют уменьшение оптической плотности при 340 нм.

Аллостерические свойства фосфофруктокиназы

Для изучения аллостерических свойств фермента используют реакционную смесь с низким значением рН (указаны конечные concentra-

ции): 25 мМ Na-β-глицерофосфат — 25 мМ глицилглицин, рН 7,0; 0,1 мМ ЭДТА; 0,2 мМ дитиотреитол; 50 мМ KCl; 4 мМ Mg(CH₃COO)₂; 0,2 мМ НАДН; 1 мМ фруктозо-6-фосфат; 1 мМ АТФ; фосфофруктокиназа и сопрягающие ферменты (см. методы I и II). Реакцию начинают добавлением фруктозо-6-фосфата. Ферменты, используемые для сопряжения, предварительно диализуют против 50 мМ трис-HCl, рН 7,5, содержащего 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотреитол.

Выделение и очистка фосфофруктокиназы из скелетных мышц кролика

Метод I

Реактивы:

1. KF=30 мМ раствор, содержащий 4 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, рН 7,5 (раствор для экстракции).
2. Трис — 1 М раствор.
3. Ацетон (технический).
4. Сухой лед.
5. Изопропиловый спирт.
6. Трис-фосфатный буфер — 0,1 мМ раствор, рН 8,0, содержащий 0,2 мМ ЭДТА и 0,2 мМ фруктозо-1,6-дифосфат.
7. Сульфат аммония — сухой, перекристаллизованный из 5 мМ ЭДТА, рН 8,2, мелко измельченный.
8. Na-β-глицерофосфатный буфер — 50 мМ раствор, рН 7,2, содержащий 2 мМ ЭДТА и 2 мМ АТФ.
9. Na-β-глицерофосфатный буфер — 50 мМ раствор, рН 7,2, содержащий 2 мМ ЭДТА, 2 мМ АТФ, 38%-ный (NH₄)₂SO₄ (21,3 г на 10 мл).
10. Na-β-глицерофосфатный буфер — 50 мМ раствор, рН 7,2, содержащий 2 мМ ЭДТА, 2 мМ АТФ, 40%-ный (NH₄)₂SO₄ (22,6 г на 100 мл).

Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Работу проводят при 0—4° С. Трис перекристаллизовывают из горячего этилового спирта, нагревая раствор с обратным холодильником. Раствор фтористого калия приготавливают непосредственно перед употреблением.

Получение экстракта. Измельченную в мясорубке мышечную массу (см. с. 221) взвешивают и заливают двойным объемом раствора для экстракции, гомогенизируют 30 с. Массу отжимают через двойной слой марли и повторяют гомогенизацию в равном объеме того же раствора. Экстракты объединяют и центрифугируют 30 мин при 10 000 g. Супернатант фильтруют через стеклянную вату и доводят рН до 6,8 добавлением 1 М триса.

Осаждение изопропиловым спиртом. Полученный экстракт помещают в сосуд с охлаждающей смесью (сухой лед — ацетон) с температурой минус 6 — минус 8° С. Экстракт охлаждают до 0° С, после чего начинают добавлять небольшими порциями при постоянном перемешивании предварительно охлажденный изопропиловый спирт (всего добавляют 1/5 объема экстракта). Температуру экстракта по мере добавления спирта понижают до —5° С (если происходит замерзание, необходимо удалить экстракт из охлаждающей смеси). После добавления всего количества изопропилового спирта продолжают перемешивание в течение 30 мин при —5° С. Осадок собирают центрифугированием

(30 мин, 10 000 g при -5°C) и растворяют в 0,1 М трис-фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 0,2 М ЭДТА, 0,2 М фруктозо-1,6-дифосфат (примерно в 1/15 от объема первой фракции, полученной после экстракции). Суспензию диализуют против того же буфера в течение ночи

Тепловая обработка. Помещают суспензию в водяную баню, нагретую до 70°C . При постоянном перемешивании температуру суспензии доводят до 57°C (59°C), выдерживают 3 мин и быстро охлаждают в сосуде со льдом до 5°C . После центрифугирования (20 мин при 4°C , при 16 000 g) осадок еще раз суспендируют в небольшом объеме трис-фосфатного буфера и центрифугируют, как прежде. Супернатанты объединяют.

Фракционирование сульфатом аммония. Объединенный супернатант помещают в сосуд с тающим льдом и при постоянном перемешивании добавляют сульфат аммония до 38%-ного насыщения (21,3 г на 100 мл). Продолжают перемешивание еще 30 мин, после чего центрифугируют 20 мин при 10 000 g. Осадок отбрасывают. К супернатанту добавляют сульфат аммония до 55%-ного насыщения (10,1 г на 100 мл). Осадок, содержащий фермент, собирают центрифугированием и растворяют в небольшом объеме 50 мМ Na- β -глицерофосфатного буфера (рН 7,2), содержащего 2 мМ ЭДТА, 2 мМ АТФ и сульфат аммония при 38%-ном насыщении. Проводят диализ против того же буфера.

Кристаллизация. Осадок, образующийся в первые 4 ч диализа, удаляют центрифугированием. Кристаллизация начинается примерно через неделю. Через несколько дней после начала кристаллизации диализный мешочек переносят в буфер того же состава, но содержащий сульфат аммония при 40%-ном насыщении и оставляют до окончания кристаллизации.

Перекристаллизация. Кристаллическую суспензию фосфофруктокиназы центрифугируют. Кристаллы растворяют в Na- β -глицерофосфате — ЭДТА — АТФ, рН 7,2. Нерастворившийся осадок отбрасывают после центрифугирования, а супернатант используют для повторной кристаллизации. Кристаллы фосфофруктокиназы собирают центрифугированием, суспендируют в небольшом объеме Na- β -глицерофосфатного буфера, рН 7,2, содержащего 2 мМ ЭДТА, 2 мМ АТФ и сульфат аммония при 40%-ном насыщении. В этом растворе фермент хранят при 4°C .

Метод II

Реактивы:

1. ЭДТА 4 мМ — 10 мМ 2-меркаптоэтанол — 30 мМ KF, рН 7,5 (раствор для гомогенизации).
2. Трис-HCl 25 мМ раствор, содержащий 30 мМ KF, рН 7,2.
3. Трис-HCl — 50 мМ раствор, рН 8,0.

KF и 2-меркаптоэтанол добавляют непосредственно перед использованием растворов. Реактивы готовят на бидистиллированной воде. Трис перекристаллизовывают из горячего $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Работу проводят при $0-4^{\circ}\text{C}$.

Гомогенизация. Измельченную мышечную массу (с. 221) взвешивают и заливают двойным объемом (по отношению к весу) раствора для гомогенизации. Гомогенизируют в течение 45 с (гомогенизатор с металлическими ножами). Гомогенат отжимают через двойной слой мар-

ли и процесс повторяют в равном объеме того же раствора. Белковые экстракты объединяют и центрифугируют при 22 500 g в течение 20 мин. Супернатант фильтруют через стекловату.

Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0—40%). К экстракту медленно при постоянном перемешивании добавляют сухой (высушенный над CaCl_2), тонко растертый в ступке сульфат аммония в количестве 243 г/л. Через 30—40 мин центрифугируют (22 500 g, 15 мин) Осадок отбрасывают.

Повторное фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40—50%). К прозрачному супернатанту добавляют сухой сульфат аммония (63 г/л) небольшими порциями с промежутками по 10 мин при постоянном перемешивании. При насыщении до 50% перемешивание продолжают в течение 45 мин, после чего суспензию центрифугируют 15 мин при 22 000 g. Супернатант при отсутствии в нем ферментативной активности отбрасывают. Осадок растворяют в минимальном объеме 25 мМ трис- HCl буфера, pH 7,2, содержащего 30 мМ KF (примерно в 6 мл, если взято 400 г мышц). Суспензию центрифугируют при 22 500 g в течение 15 мин.

Удаление сульфата аммония. Супернатант, полученный на предыдущей стадии, пропускают через колонку (1×21,5 см), заполненную сефадексом G-25, уравновешенную буфером 25 мМ трис- HCl — 30 мМ KF, pH 7,2 (пропускают примерно 150 мл). На колонку можно нанести 700—2500 единиц активности. Сразу после выхода раствора, соответствующего свободному объему колонки, в первых 4—5 мл содержится основная часть ферментативной активности. Эту фракцию белка выдерживают при 0—4°C в течение 2,5 ч (происходит агрегация фермента), после чего центрифугируют при 30 000 g в течение 30 мин.

Концентрирование раствора белка $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0—50%). К супернатанту, полученному на предыдущей стадии, добавляют сульфат аммония до 50%-ного насыщения (313 г/л) и затем центрифугируют (22 500 g, 15 мин).

Осадок растворяют в 25 мМ трис- HCl — 30 мМ KF, pH 7,2 (примерно в 3 мл). Супернатант, содержащий ферментативную активность, можно хранить при 0—4°C в течение суток.

Удаление сульфата аммония. Фракцию белка, насыщенную сульфатом аммония до 50%, вновь хроматографируют на колонке в тех же условиях, как описано выше. Первые порции элюата, собранные сразу после выхода свободного объема колонки, содержат фермент. Этот раствор выдерживают в течение 2,5 ч при 0—4°C. Образующийся осадок собирают центрифугированием (18 000 об/мин, 30 мин). Супернатант отбрасывают (предварительно проверяют на ферментативную активность).

Промывание осадка. Осадок суспендируют в буфере 25 мМ трис- HCl — 30 мМ KF, pH 7,2 (примерно в 40 мл). Суспензию центрифугируют при 11 500 g в течение 10 мин. Осадок промывают еще раз. Затем осадок суспендируют в 50 мМ трис- HCl буфере, pH 8,0 (примерно в 4 мл), осторожно перемешивают 2—3 мин и центрифугируют при 11 500 g в течение 10 мин. Процедуру промывания повторяют еще два раза.

Солюбилизация АТФ. Промытый осадок растворяют в 3 мл (в расчете на 400 г мышц, использованных для экстракции фермента) 10 мМ раствора АТФ, pH 7,2. Нерастворившийся белок отбрасывают центрифугированием при 11 500 g в течение 10 мин. Супернатант, содержащий фосфофруктокиназу, разливают на несколько порций и хранят при —70°C.

Для растворения высокомолекулярных агрегатов фермента можно использовать другие эффекторы, такие, как фруктозо-6-фосфат (5 мМ), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50%), неорганический фосфат (50 мМ), однако наиболее эффективным действием обладает 10 мМ АТФ, рН 7,2. При той же концентрации АТФ, но при рН 8,0 растворимость фермента значительно меньше.

Примечание. Чтобы избежать агрегации фермента на колонке во время гель-фильтрации, необходимо наносить не менее 30% объема исследуемого раствора от объема колонки.

Метод III

Реактивы:

1. К-Фосфатный буфер — 10 мМ раствор, рН 7,5, содержащий 30 мМ KF и 3 мМ ЭДТА.
2. NH_4OH — 4 М раствор.
3. Сульфат аммония (сухой, перекристаллизованный из 5 мМ раствора ЭДТА, рН 8,2, мелко измельченный).
4. Трис-фосфатный буфер — 50 мМ раствор, рН 8,0, содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол и 0,2 мМ фруктозо-1,6-дифосфат (буфер А).
5. Трис-фосфатный буфер — 50 мМ раствор, рН 8,0, содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 0,2 мМ фруктозо-1,6-дифосфат и 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (буфер Б).
6. Трис-фосфатный буфер — 50 мМ раствор, рН 8,0, содержащий 0,1 мМ ЭДТА (буфер В).
7. Трис-фосфатный буфер — 0,3 М раствор, рН 8,0, содержащий 0,1 мМ ЭДТА.
8. Биогель А — 1,5 т (или сефароза 4В).
9. ДЭАЭ-сефадекс А-50.

Растворы готовят на бидистиллированной воде. Трис перекристаллизовывают, как указано выше (с. 241). Работу проводят при 0—4° С.

Получение экстракта. Измельченную мышечную массу (с. 221) взвешивают, добавляют тройной объем К-фосфатного буфера — 10 мМ (рН 7,5), содержащего 30 мМ KF и 3 мМ ЭДТА и гомогенизируют 30 с. Перемешивают 5—10 мин и центрифугируют 50 мин при 10 000 g. Супернатант доводят до рН 7,5 добавлением 4 М NH_4OH .

Фракционирование сульфатом аммония. К супернатанту медленно добавляют сухой сульфат аммония при постоянном перемешивании до 45%-ного насыщения. Продолжают перемешивание в течение часа и оставляют на ночь. Центрифугируют 50 мин при 10 000 g. Осадок отбрасывают. К супернатанту добавляют сульфат аммония до 55%-ного насыщения. Продолжают перемешивание в течение часа. Осадок, содержащий фосфофруктокиназу, собирают центрифугированием (30 мин при 15 000 g) и осторожно суспендируют в минимальном объеме буфера А.

Гель-хроматография. Раствор фосфофруктокиназы наносят на колонку (4×50 см), заполненную биогелем А—1,5 т, предварительно уравновешенную буфером Б. Этим же буфером проводят элюцию белка с колонки. Во фракциях измеряют концентрацию белка и ферментативную активность. Фракции белка, содержащие наибольшую активность, объединяют. К объединенному раствору добавляют сульфат аммония до 55%-ного насыщения. Продолжают перемешивание в течение

ние часа (можно оставить на ночь). Осадок собирают центрифугированием (20 мин при 15 000 g) и осторожно растворяют в буфере А, используя минимальный объем раствора.

Повторная гель-хроматография. Раствор фосфофруктокиназы наносят на колонку (2,2×60 см), заполненную биогелем А—1,5 m, уравновешенную буфером А. Фермент элюируют тем же буфером. Фракции с наибольшей удельной активностью объединяют.

Фракционирование сульфатом аммония. К объединенному раствору добавляют сульфат аммония при постоянном перемешивании до 60%-ного насыщения. Продолжают перемешивание в течение часа. После центрифугирования (20 мин при 15 000 g) осадок суспендируют в минимальном объеме буфера В. Суспензию диализуют против 20-кратного объема того же буфера не менее 8 ч.

Ионообменная хроматография. После диализа раствор наносят на колонку (4×20 см), заполненную ДЭАЭ-сефадексом А-50, уравновешенную буфером В. Колонку промывают тем же буфером (500 мл), после чего проводят элюцию 0,3 М трис-фосфатным буфером, рН 8,0, содержащим 0,1 мМ ЭДТА (500 мл). Фракции, содержащие фермент, объединяют и добавляют сульфат аммония до 80%-ного насыщения. Продолжают перемешивание в течение часа, центрифугируют (20 мин при 15 000 g). Осадок осторожно суспендируют в буфере В, насыщенном сульфатом аммония, и хранят при 4°С.

Примечание. При замене одного буферного раствора на другой раствор белка пропускают через колонку (1,2×10 см), заполненную сефадексом G-25.

Указанные размеры колонок при гель-хроматографии и при ионообменной хроматографии рассчитаны на получение фермента из 500 г мышечной массы.

ЛИТЕРАТУРА

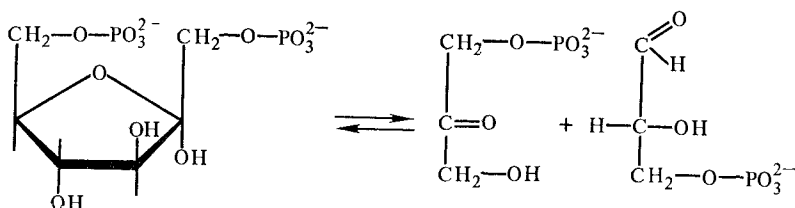
1. Bloxham D. P., Lardy H. A. Phosphofructokinase.//The Enzymes. N. Y. 1973. Vol. 8. P. 239.
2. Kemp R., Foe L. Allosteric regulatory properties of muscle Phosphofructokinase.//Molecul. Cell. Biochem. 1983. Vol. 57, N 2. P. 147.
3. Kemp R. G. Phosphofructokinase from rabbit skeletal muscle. N. Y.//Methods in Enzymology. 1975. Vol. 42C. P. 71.
4. Pandian S., Bhatia M., Ramaiah A. et al. Purification of Phosphofructokinase from rabbit skeletal muscle based on its ability to aggregate in absence of its effectors.//Analytical Biochemistry. 1983. Vol. 128, N 2. P. 363.
5. Ogawa Y., Atkinson D. E. Interaction between citrate and nucleoside triphosphates in binding to Phosphofructokinase.//Biochemistry. 1985. Vol. 24, N 4. P. 954.
6. Luther M. A., Hesterberg Z. K., Lee J. C. Subunit interaction of rabbit muscle Phosphofructokinase: effects of purification procedures.//Biochemistry. 1985. Vol. 24, N 10. P. 2463.
7. Рапанович И. И. Мышечная фосфофруктокиназа: классический аллостерический фермент.//Усп. совр. биохим. М., 1984. Т. 25. С. 236.

8. АЛЬДОЛАЗА

(D-фруктозо-1,6-дифосфат-D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза,
КФ 4.1.2.13)

Альдолаза катализирует реакцию расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на 3-фосfogлицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон. Альдолаза мышечной ткани — тетрамер (молекулярная масса 162 000),

построенный из одинаковых субъединиц. В активном центре идентифицирован остаток лизина, а также цистеин, SH-группа которого мало



реакционноспособна. Каждая субъединица содержит 8 цистеиновых остатков. Фермент ингибируется ионами тяжелых металлов. АТФ, АДФ и АМФ являются ингибиторами. Альдолаза специфична к фосфодиоксиацетону, тогда как глицеральдегид-3-фосфат может быть заменен другими альдегидами. Фермент из мышц способен расщеплять фруктозо-1-фосфат, но с меньшей скоростью, чем фруктозо-1,6-дифосфат. Константы Михаэлиса: для фруктозо-1,6-дифосфата — 0,014 мМ, для фруктозо-1-фосфата — 7,0 мМ.

Определение активности альдолазы

Активность альдолазы может быть измерена двумя методами: химическим, основанным на определении концентрации продуктов реакции — фосфотриоз (по нарастанию щелочнолабильного фосфора), и энзиматическим, в сопряженной системе, содержащей помимо альдолазы и фруктозо-1,6-дифосфата также НАД⁺ и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу или НАДН и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу. Скорость альдолазной реакции определяют по нарастанию или убыли НАДН.

Химический метод

Метод основан на измерении количества щелочнолабильного фосфора триозофосфатов. Реакция проводится либо в присутствии цианида (вариант I), либо в присутствии гидразина (вариант II).

Вариант I

Реактивы:

1. Глициновый буфер — 0,1 М раствор, рН 9,0, содержащий 5 мМ ЭДТА.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат — 2 мМ раствор, приготовленный на 0,1 М глициновом буфере рН 9,0.
3. KCN — 0,1 М раствор, подкисленный до рН 9,0. Работа с цианидом должна проводиться под тягой, раствор следует набирать автоматической пипеткой.
4. NaOH — 2 н. раствор.
5. HCl — 2 н. раствор.
6. Реактивы для определения фосфора методом Фiske—Суббароу (с. 34).

В 4 пробирки помещают по 0,1 мл фруктозодифосфата и 0,2 мл раствора KCN. В каждую пробирку последовательно, с интервалом в

4—5 мин, вносят по 0,1 мл раствора, содержащего альдолазу, отмечают начало реакции по секундомеру. Инкубацию в первой пробирке проводят в течение 30 с, во второй — 60, в третьей — 90 и в четвертой — 120 с, останавливая реакцию добавлением 0,4 мл 2 н. NaOH. После перемешивания пробы оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем нейтрализуют добавлением 0,4 мл 2 н. HCl и определяют в них содержание неорганического фосфора. В качестве контроля используют пробу, содержащую вместо раствора альдолазы 0,1 М глициновый буфер.

Вариант II

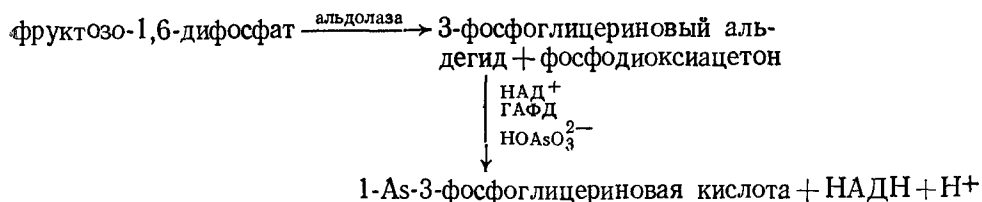
Реактивы:

1. Триэтаноламиновый буфер — 0,1 М раствор pH 8,0.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат — 2 мМ раствор, pH 8,0.
3. Гидразин — 0,1 М раствор, pH 8,0.
4. NaOH — 2 н. раствор.
5. HCl — 2 н. раствор.
6. Реактивы для определения фосфора методом Фiske—Суббароу (с. 34).

В 4 пробирки помещают по 1 мл триэтаноламинового буфера, 0,25 мл раствора (2 мМ) фруктозо-1,6-дифосфата, 0,25 мл раствора (0,1 М) гидразина. В каждую пробирку последовательно, с интервалом в 2—3 мин, вносят по 20 мкл раствора, содержащего альдолазу, отмечая начало реакции по секундомеру. Инкубацию в первой пробирке проводят в течение 30 с, во второй — 60, в третьей — 90 и в четвертой — 120 с, останавливая реакцию добавлением 1,5 мл 2 н. NaOH. После перемешивания пробы оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем нейтрализуют добавлением 1,5 мл 2 н. HCl и определяют в них содержание Φ_n . В качестве контроля используют пробу, содержащую вместо раствора альдолазы 0,1 М триэтаноламиновый буфер.

Энзиматический метод

Определение активности альдолазы этим способом основано на применении сопряженной системы, в которой в качестве вспомогательного фермента используется глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД):



Реактивы:

1. Триэтаноламиновый буфер — 0,1 М раствор pH 8,0, содержащий 5 мМ ЭДТА.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат — 2 мМ раствор, pH 8,0.
3. НАД⁺ — 50 мМ раствор.

4. Арсенат натрия — 50 мМ раствор.
5. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Кристаллическую суспензию растворяют в 5 мМ ЭДТА (рН 7,5) до получения раствора, содержащего 10 единиц активности/0,1 мл (см. также с. 253).

В спектрофотометрическую кювету помещают 2 мл 0,1 М триэтаноламинового буфера, рН 8,0, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (30 единиц активности), а также растворы фруктозо-1,6-дифосфата (0,2 мМ), НАД⁺ (3 мМ) и арсената натрия (5 мМ) с таким расчетом, чтобы после доведения объема пробы до 3 мл их конечные концентрации соответствовали величинам, указанным в скобках. После перемешивания начинают реакцию добавлением 30—50 мкл раствора альдозы. Отмечают нарастание поглощения при 340 нм.

Определение белка проводят спектрофотометрически, учитывая, что $A = 1\%_{\text{см}}$ для альдозы соответствует 9,1 при 280 нм.

Выделение альдозы из скелетных мышц кролика

Реактивы:

1. Сульфат аммония (перекристаллизованный в присутствии ЭДТА) — насыщенный раствор, рН 7,5.
2. Сульфат аммония — насыщенный раствор, рН 5,7.
3. ЭДТА — 5 мМ раствор, рН 7,5.
4. Аммиак.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

Экстракция. К 250—300 г мышечной массы кролика (с. 221) добавляют равный объем охлажденного 5 мМ раствора ЭДТА и перемешивают в течение 10 мин, после чего центрифугируют (20 мин при 10 000 g). Экстракцию повторяют, используя такое же количество раствора ЭДТА. Экстракты соединяют.

Фракционирование сульфатом аммония. Доводят рН экстракта до 7,5 холодным разведенным аммиаком. Добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония (рН 7,5), осторожно перемешивают и оставляют на 15 мин на холоде. Последующие этапы работы проводят в холодной комнате. Центрифугируют (20 мин при 15 000 g). Супернатант доводят до насыщения 0,52 (добавлением 4 мл насыщенного раствора сульфата аммония, рН 7,5, на каждые 100 мл раствора); рН доводят аммиаком до 8,0—8,1. Альдоза кристаллизуется в течение нескольких часов или нескольких дней. Начало кристаллизации может быть ускорено постепенным нагреванием раствора до комнатной температуры с последующим охлаждением до 0—5° С.

Перекристаллизация. Осадок отделяют центрифугированием (20 мин при 15 000 g) и растворяют в 5 мМ ЭДТА, рН 7,0, до получения концентрации белка 20—30 мг/мл. Медленно, при осторожном перемешивании, добавляют насыщенный раствор сульфата аммония (рН 7,5) до появления аморфного осадка, который удаляют центрифугированием. К центрифугату продолжают добавлять насыщенный раствор сульфата аммония до начала кристаллизации. Перекристаллизацию можно повторить. Кристаллы альдозы хранят на холоде в полунасыщенном растворе сульфата аммония.

Кристаллизация в виде бипирамид. К прозрачному раствору, приготовленному путем растворения кристаллов альдозы (имеющих форму пластинок) и содержащему 15—20 мг белка/мл, добавляют на

холоде насыщенный раствор сульфата аммония (не нейтрализованный, имеющий рН 5,7) до небольшого помутнения. При этом рН раствора альдолазы должен быть около 6,0. Через 20—48 ч появляются кристаллы, имеющие форму бипирамид. Препарат фермента хранят на холоде в виде суспензии в сульфате аммония при насыщении 0,6.

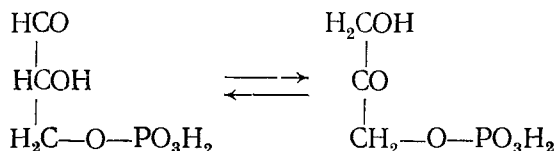
ЛИТЕРАТУРА

1. Horecker B. L., Tsolas O., Lai C. Y. Aldolases//The Enzymes. N. Y., 1972. Vol. 7. P. 213.
2. Ting S. M., Sia C. L. et al. Frog muscle aldolase: purification of the enzyme and structure of the active site//Arch. Biochem. Biophys. 1971. Vol. 144. P. 485.
3. Chappel A., Hoogenraad N. J., Holmes R. S. Purification and properties of the native form of rabbit liver aldolase//Biochem. J. 1975. Vol. 175. P. 377.

9. ТРИОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗА

(*D*-глицеральдегид-3-фосфат-кетотриозоизомераза, КФ 5.3.1.1)

Триозофосфатизомераза — фермент гликолиза, катализирует обратимую реакцию превращения *D*-глицеральдегид-3-фосфата в диоксиацетонфосфат:



Фермент относят к классу изомераз. Он широко представлен в природе. Для своего действия не требует наличия кофакторов.

Триозофосфатизомераза пивных дрожжей имеет молекулярную массу 53 000 Да, состоит из двух неидентичных субъединиц. Оптимум рН в триэтанолламин-НСl-буфере — 7,0—8,5 и 7,6—9,5 соответственно при определении активности с использованием в качестве вспомогательного фермента глицерол-3-фосфатдегидрогеназы или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Константа равновесия реакции изомеризации *D*-глицеральдегид-3-фосфата при рН 7,5 и 25°C равна 19. K_m для этого субстрата при тех же условиях — $1,27 \times 10^{-3}$ М, а для диоксиацетонфосфата — $1,23 \times 10^{-3}$ М. $A^{1\%}_{1\text{см}}$ при 280 нм равна 9,9.

Определение активности триозофосфатизомеразы

Активность триозофосфатизомеразы можно измерять по убыли или образованию НАДН в зависимости от того, используется ли в качестве субстрата глицеральдегид-3-фосфат, а в качестве вспомогательного фермента — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа или соответственно диоксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. В обоих случаях за ходом реакции следят спектрофотометрически, определяя изменение оптической плотности при 340 нм (с. 7).

В а р и а н т I

Реактивы:

1. Триэтанолламинный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,5.
2. Триэтанолламинный буфер — 10 мМ раствор, рН 7,5.
3. НАДН — 14 мМ раствор, рН 8,0.

4. *D-L*-глицеральдегид-3-фосфат — 90 мМ раствор, рН 5,0. К препарату бариевой соли *D-L*-глицеральдегид-3-фосфатдиэтилацетата, суспендированному в небольшом объеме воды, добавляют Дауэкс-50 в H^+ -форме, 200—400 меш. (1 г на каждые 80 мг бариевой соли), интенсивно встряхивают до растворения соли и помещают на 3,5 мин в кипящую водяную баню. Затем фильтруют с отсасыванием и осадок промывают водой, объем которой должен быть равен тому объему воды, в котором суспендировали исходную соль. Промывные воды объединяют с основным фильтратом, добавляют мелкоизмельченный бикарбонат натрия до рН 5,0 и доводят водой до нужного объема. Хранят в замороженном состоянии. Можно использовать кальциевую соль *D*-глицеральдегид-3-фосфата, переводя ее предварительно в натриевую.
5. Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа — 70 Е/мл, свежеприготовленный раствор на 10 мМ триэтаноламиновом буфере, рН 7,5. В нем не должно содержаться сульфата аммония, который ингибирует триозофосфатизомеразу.
6. Триозофосфатизомераза — 0,4 Е/мл, свежеприготовленный раствор на 10 мМ триэтаноламиновом буфере, рН 7,5.

В спектрофотометрическую кювету помещают реакционную смесь, содержащую (указаны конечные концентрации) 80 мМ буфер, 0,25 мМ НАДН, 0,1 мл глицеральдегид-3-фосфата и 0,05 мл глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Перемешивают и устанавливают величину оптической плотности при 340 нм по шкале спектрофотометра на отметке 0,4—0,5. Добавляют 0,05 мл триозофосфатизомеразы (общий объем пробы — 3 мл), перемешивают и измеряют уменьшение оптической плотности в течение 3—5 мин. В контрольную кювету вместо триозофосфатизомеразы добавляют соответствующий объем 10 мМ триэтаноламинового буфера, рН 7,5.

В а р и а н т II

Реактивы:

1. Триэтаноламиновый буфер — 7,5 мМ раствор, рН 7,6.
2. Триэтаноламиновый буфер — 30 мМ раствор, рН 7,6.
3. ЭДТА — 30 мМ раствор, рН 7,6.
4. Диоксиацетонфосфат — 75 мМ раствор, рН 6,0.
5. НАД — 6 мМ раствор, рН 6,0. Может несколько дней хранить-ся в холодильнике.
6. Арсенат натрия — 78 мМ раствор.
7. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (освобожденная от сульфата аммония), не содержащая триозофосфатизомеразы и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы — 75 Е/мл, свежеприготовленный раствор на 30 мМ триэтаноламиновом буфере.
8. Триозофосфатизомераза — 2 Е/мл, свежеприготовленный раствор на 30 мМ триэтаноламиновом буфере.

В спектрофотометрическую кювету помещают реакционную смесь, содержащую (указаны конечные концентрации) 30 мМ буфер, 1 мМ

ЭДТА, 5 мМ диоксиацетонфосфат, 0,3 мМ НАД, 13 мМ арсенат натрия, 0,04 мл глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и 0,01 мл триозофосфатизомеразы (общий объем пробы — 3 мл). Перемешивают и в течение 3—5 мин измеряют увеличение оптической плотности при 340 нм. В контрольную кювету вместо раствора триозофосфатизомеразы добавляют соответствующий объем 30 мМ триэтаноламинового буфера.

Арсенат оказывает ингибирующее действие на триозофосфатизомеразу, поэтому первый способ определения активности предпочтительнее.

Выделение фермента из дрожжей

Реактивы:

1. Гидроокись аммония — 1 М раствор.
2. ЭДТА — 0,5 М раствор.
3. Сульфат аммония, порошок.
4. Метанол.
5. Протаминсульфат — раствор, содержащий 2 г протаминсульфата и 3,2 мл 0,1 М натриевой щелочи в 100 мл воды.
6. Триэтаноламин-НСl-буфер — 10 мМ раствор, рН 8,0.
7. ДЭАЭ-сефадекс А-25, уравновешенный 10 мМ триэтаноламин-НСl-буфером, рН 8,0 (с. 109).
8. Триэтаноламин-НСl-буфер — 10 мМ раствор, содержащий 0,15 М хлористый натрий, рН 8,0.
9. Фосфатный буфер — 10 мМ раствор, рН 6,5.
10. КМ-сефадекс С-50, уравновешенный 10 мМ фосфатным буфером, рН 6,5 (с. 109).
11. Фосфатный буфер — 10 мМ раствор, содержащий 0,15 М хлористый натрий, рН 6,5.
12. Ацетатный буфер — 0,5 М раствор, рН 4,6.
13. Сульфат аммония — 2,5 М раствор, приготовленный на 10 мМ фосфатном буфере, рН 6,5.

Подготовка исходного материала. Пивные или пекарские дрожжи несколько раз промывают водопроводной водой, центрифугируют в рефрижераторной центрифуге 10—15 мин при 18 000 g и сушат на воздухе при комнатной температуре, помещая их на металлическую сетку, покрытую листами фильтровальной бумаги. Сухие дрожжи хранят в герметической упаковке на холоде. Перед использованием измельчают в шаровой мельнице.

Экстракция. 260 г сухих дрожжей и 490 мл 1 М гидроокиси аммония перемешивают при комнатной температуре в течение 20 ч, добавляют 1,2 л воды, 34 мл 0,5 М раствора ЭДТА и отдельными порциями, при перемешивании, сульфат аммония до 0,35 М концентрации.

Тепловая обработка. Полученную суспензию отдельными порциями нагревают до 60°С в водяной бане на 80—85°С, затем на 10 мин помещают в водяной термостат при 60°С. Центрифугируют 20 мин при 15 000 g и осадок отбрасывают.

Фракционирование сульфатом аммония. К центрифугату в течение 6 ч при перемешивании добавляют сульфат аммония до 1,3 М концентрации, продолжают перемешивание при комнатной температуре еще 2 ч. Центрифугируют при 15 000 g в течение 10 мин, осадок отбрасывают, а к центрифугату, как и в первый раз, но теперь уже в течение 4 ч добавляют сульфат аммония до 2,9 М концентрации и остав-

ляют на ночь в холодильнике. Центрифугируют 20 мин при 40 000 g и осадок растворяют в 200 мл холодной бидистиллированной воды.

Фракционирование метанолом. К ферментному раствору при перемешивании добавляют в течение 3 ч 110 мл ледяного метанола, центрифугируют 10 мин при 40 000 g и осадок отбрасывают. Центрифугат упаривают наполовину в роторном испарителе при 20°C и добавляют к нему при перемешивании 53 г сульфата аммония. Перемешивание продолжают при 20°C еще 2 ч, центрифугируют 20 мин при 40 000 g, осадок растворяют в минимальном объеме холодной воды и диализуют в течение ночи против 5 л воды при перемешивании.

Обработка протаминсульфатом. К отдиализованному раствору добавляют по каплям, при перемешивании, раствор протаминсульфата до прекращения образования осадка, после чего центрифугируют 10 мин при 40 000 g и осадок отбрасывают.

Хроматографирование на ДЭАЭ-сефадексе и кристаллизация. К центрифугату при перемешивании добавляют сульфат аммония до насыщения 0,9. Центрифугируют 20 мин при 40 000 g, осадок растворяют в минимальном объеме холодной воды, диализуют в течение ночи против 5 л воды при помешивании и наносят на колонку ДЭАЭ-сефадекса А-25 (65×4,5 см), уравновешенную 10 mM триэтаноламин-HCl-буфером, pH 8,0. Фермент элюируют при комнатной температуре линейным градиентом хлористого натрия (от 0 до 0,15 M) в буфере, используя для этого 1,5 л 10 mM триэтаноламин-HCl-буфера, pH 8,0, и 1,5 л 0,15 M хлористого натрия, приготовленного на том же буфере. Триозофосфатизомераза обычно начинает сходить с колонки после пропускания 1,5 л элюирующего раствора и собирается в объеме примерно 500 мл. Основные фракции пика (около 90% активности) объединяют; осторожно, небольшими порциями, при перемешивании добавляют сульфат аммония до слабого помутнения и оставляют в холодильнике. Кристаллизация обычно начинается в течение 12 ч.

Хроматографирование на КМ-сефадексе и перекристаллизация. Суспензию кристаллов центрифугируют 20 мин при 40 000 g, осадок растворяют в минимальном объеме холодной воды, диализуют, как указано выше, и наносят на колонку КМ-сефадекса С-50 (60×4,5 см), уравновешенного 10 mM фосфатным буфером, pH 6,5. Триозофосфатизомеразу элюируют при комнатной температуре линейным градиентом хлористого натрия (от 0 до 0,15 M) в буфере, используя для этого 800 мл 10 mM фосфатного буфера, pH 6,5, и 800 мл 0,15 M хлористого натрия в том же буфере. Обычно после пропускания 300 мл элюирующего раствора фермент начинает сходить с колонки и собирается примерно в 200 мл.

Фракции, содержащие основное количество триозофосфатизомеразы, объединяют, добавляют при перемешивании 0,5 M ацетатный буфер до pH 6,0, затем сульфат аммония до слабого помутнения и оставляют в холодильнике. В течение суток фермент обычно начинает кристаллизоваться. По окончании кристаллизации суспензию центрифугируют 20 мин при 40 000 g и осадок суспендируют в минимальном объеме 10 mM фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 2,5 M сульфат аммония. В холодильнике препарат сохраняет свою активность по крайней мере в течение двух лет.

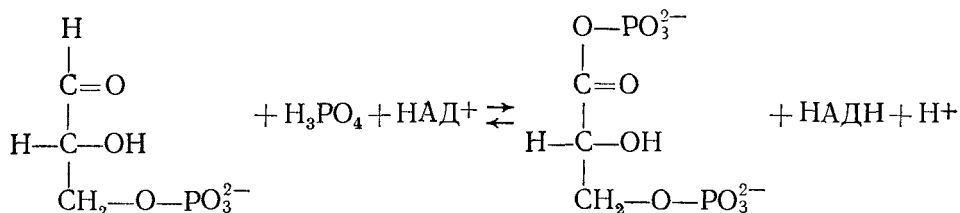
ЛИТЕРАТУРА

Nollmann E. A. Aldose-Ketose Isomerase//The Enzymes. N. Y., 1972. Vol. 6. P. 326.

10. ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА

(D-глицеральдегид-3-фосфат: НАД⁺-оксидоредуктаза фосфорилирующая, КФ 1.2.1.12)

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) катализирует реакцию окисления глицеральдегид-3-фосфата, сопряженную с фосфорилированием:



Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа — тетрамер (м. м. = 144 000 Да), построенный из химически идентичных субъединиц. Центральную роль в катализе выполняет цистеиновый остаток. Фермент ингибируется ионами тяжелых металлов. Константы Михаэлиса глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из мышц кролика: для НАД⁺ — 13 мкМ, для глицеральдегид-3-фосфата — 90 мкМ, для фосфата — 0,29 мМ; для фермента из дрожжей: для НАД⁺ — 44 мкМ, для глицеральдегид-3-фосфата — 160 мкМ, для Ф_н — 0,3 мМ; АМФ, АДФ, АТФ являются коэнзим-конкурентными ингибиторами. В энзиматической реакции фосфат может быть заменен на арсенат, что делает реакцию необратимой.

Определение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы измеряют спектрофотометрически по нарастанию (в прямой реакции) или по уменьшению (в обратной) поглощения при 340 нм. Ниже приводится только первый вариант.

Реактивы:

1. Буфер: 0,1 М глициновый или 40 мМ триэтаноламиновый, рН 8,9 (фермент из мышц кролика) либо 50 мМ пирофосфатный, рН 8,3 (фермент из пекарских дрожжей).
2. Na₂HPO₄ — 0,5 М раствор.
3. Na₃AsO₄ — 50 мМ раствор.
4. 3-фосфоглицериновый альдегид — 10 мМ раствор.
5. НАД⁺ — 10 мМ раствор.
6. ЭДТА — 50 мМ раствор.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

В спектрофотометрическую кювету помещают 2 мл соответствующего буферного раствора, а также НАД⁺ (конечная концентрация 1 мМ), фосфат натрия (конечная концентрация 50 мМ) либо арсенат натрия (конечная концентрация 5 мМ), ЭДТА (конечная концентрация 5 мМ), 1—2 мкг фермента. Объем пробы доводят до 3 мл (концентрации компонентов реакционной смеси рассчитаны на этот объем). Реакцию начинают добавлением 3-фосфоглицеринового альдегида в объеме 20—30 мкл.

Определение белка проводят спектрофотометрически, учитывая, что поглощение раствора фермента при 280 нм зависит от количества НАД⁺, связанного с белком. Существуют следующие соотношения между A_{280}/A_{260} и коэффициентами экстинкции:

Фермент из мышц кролика	
A_{280}/A_{260}	$A_{1\text{ см}}^{1\% \text{ см}^2 \text{ мг}^{-1}}$
2,2 (апофермент) 1,06 (холофермент)	8,3 10,0
Фермент из пекарских дрожжей	
A_{280}/A_{260}	$A_{1\text{ см}}^{1\% \text{ см}^2 \text{ мг}^{-1}}$
2,0 1,95 1,80 1,75 1,70	9,0 9,15 9,2 9,4 9,5

Выделение фермента из скелетных мышц кролика

Метод I

Реактивы:

1. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
2. ЭДТА — 50 мМ раствор, содержащий 0,2 мМ дитиотреитол, доведенный аммиаком до pH 8,4.
3. ЭДТА — 5 мМ раствор, содержащий 0,2 мМ дитиотреитол, pH 7,6.

4. Аммиак.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Работу проводят при 2—4° С.

Экстракция. Измельченные мышцы (с. 221) заливают равным объемом 50 мМ ЭДТА, содержащим 0,2 мМ дитиотреитол и доведенным до pH 8,4 концентрированным аммиаком. Перемешивают механической мешалкой в течение 20 мин. Мышечную массу отделяют центрифугированием при 1000 g в течение 20 мин. Экстракцию повторяют еще дважды, используя каждый раз 0,5V раствора ЭДТА с дитиотреитолом; pH объединенного экстракта должен быть около 7,1 (при 0° С).

Фракционирование сульфатом аммония. К экстракту медленно добавляют сухой сульфат аммония в количестве 300 г/л. Через 1 ч после добавления последней порции соли осадок отделяют центрифугированием (20 000 g, 30 мин) и к супернатанту вновь добавляют сухой сульфат аммония (117 г/л). После стояния в течение часа осадок отделяют центрифугированием (20 000 g, 30 мин) и к супернатанту добавляют сульфат аммония (13 г/л); оставляют на ночь при 0° С. В процессе высаливания стараются свести к минимуму вспенивание раствора; образующуюся пену удаляют пипеткой. В ходе фракционирования поддерживают pH раствора в диапазоне 7,3—7,6 (при 0° С) путем добавления аммиака. В том случае, если на последней стадии осадок не образуется, добавляют еще сухого сульфата аммония (13 г/л).

Повторное фракционирование. Осадок, собранный центрифугированием (20 000 g, 30 мин), растворяют в минимальном объеме смеси: 5 мМ ЭДТА, 0,2 мМ дитиотреитол и доводят до pH 7,6 раствором аммиака. Раствор белка подвергают диализу против смеси того же состава, после чего добавляют к нему сухой сульфат аммония (0,39 г/мл). При этом образуется гелеобразный осадок, который после часового стояния отделяют центрифугированием (20 000 g, 30 мин). Осадок вновь растворяют в минимальном объеме 5 мМ ЭДТА с дитиотреитолом и диализуют, как описано выше. Вновь добавляют сухой сульфат аммония (0,20 г/мл). Через час отделяют осадок, если он образовал-

ся, и отбрасывают его. К прозрачному супернатанту добавляют сульфат аммония (0,15 г/мл). Через час отделяют центрифугированием гелеобразный осадок фермента. В ходе повторного фракционирования постепенно исчезает красный цвет белковых фракций. Полученный препарат фермента хранят в виде суспензии в полунасыщенном растворе сульфата аммония в присутствии 20 мМ дитиотрептола при 0—3° С.

Метод II

Реактивы:

1. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
2. КОН — 30 мМ раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА и 0,5 мМ дитиотрептол.
3. Аммиак.
4. Сульфат аммония — насыщение 0,5, содержит 5 мМ ЭДТА и 10 мМ дитиотрептол.
5. ЭДТА — 5 мМ раствор pH 7,5, содержащий 0,5 мМ дитиотрептол.
6. Пирофосфат натрия — 50 мМ раствор, содержащий 1 мМ ЭДТА и 0,2 мМ дитиотрептол, pH 8,5.
7. MOPS — 5 мМ раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотрептол, pH 6,4.
8. MOPS — 5 мМ раствор, содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрептол и 0,1 М сульфат аммония, pH 7,5.
9. Сефадексы: G-100 (для гельфльтрации), G-50 (тонкий), КМ-сефадекс (G-25).
10. НАД⁺.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Всю работу проводят при 2—4° С.

Экстракция. Измельченную мышечную массу заливают двойным (по весу) объемом экстрагирующего раствора (30 мМ КОН, 5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотрептол) и гомогенизируют с помощью блендера в течение 1 мин. Полученный гомогенат перемешивают на механической мешалке в течение 15—20 мин. Экстракт отделяют центрифугированием (20 мин при 1000 g).

Фракционирование сульфатом аммония. К полученному экстракту (pH 7,0) добавляют при постоянном перемешивании небольшими порциями мелкоизмельченный сульфат аммония (50,5 г на 100 мл раствора). Доводят pH до 7,0—7,5 добавлением концентрированного аммиака. Через 30 мин выпавший осадок удаляют центрифугированием (60 мин при 30 000 g). Доводят pH раствора до 7,8—8,0 и оставляют на ночь. Кристаллизация начинается сразу и продолжается в течение нескольких дней. Кристаллы отделяют центрифугированием (60 мин при 30 000 g) и суспендируют в растворе сульфата аммония насыщения 0,5, содержащем 5 мМ ЭДТА и 10 мМ дитиотрептол. Дальнейшая очистка фермента может проводиться следующими методами.

А. Перекристаллизация.

Осадок кристаллов растворяют в 5 мМ растворе ЭДТА с 0,5 мМ дитиотрептолом (pH 7,5) так, чтобы концентрация белка составляла 10—20 мг/мл. Нерастворившийся осадок отделяют центрифугированием. К прозрачному раствору медленно, при перемешивании на магнит-

ной мешалке, добавляют мелко измельченный сульфат аммония из расчета 41,8 г на 100 мл раствора. Доводят рН до 8,5 добавлением разведенного аммиака. Кристаллизация продолжается в течение 5 дней. Перекристаллизацию проводят еще 2—3 раза. Если в ходе перекристаллизаций не удастся освободить препарат от примеси миоглобина, окрашивающей его в розовый цвет, то раствор белка (40 мг/мл) пропускают через колонку (1,5×70 см), заполненную сефадексом G-100, уравновешенную 0,05 М раствором пирогосфата натрия с 1 мМ ЭДТА и 0,2 мМ дитиотрептолом, рН 8,5. Собирают фракции при скорости тока 0,6 мл/мин. Фермент выходит первым пиком, его раствор имеет слабо-желтую окраску. Добавлением сухого сульфата аммония вызывают кристаллизацию.

Б. Ионобменная хроматография.

Кристаллы фермента, полученные из 300 г мышц, растворяют в буфере: 5 мМ МОРS, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрептол, рН 6,4 (до концентрации 50—60 мг/мл). Прозрачный темно-красный раствор обессоливают пропусканием через колонку (4×40 см), заполненную сефадексом G-50 (тонкий) и уравновешенную тем же буфером. Обессоленный раствор белка наносят на колонку (4×40 см), заполненную КМ-сефадексом (G-25) и уравновешенную вышеуказанным буфером при рН 6,4. Тем же буфером промывают колонку до появления белка в элюате, после чего начинают элюцию фермента с помощью раствора: 5 мМ МОРS, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрептол, 0,1 М сульфат аммония, рН 7,5. Скорость элюции — 3—4 мл/10 мин. Фермент выходит с колонки размытым пиком. Объединяют фракции, содержащие активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и имеющие концентрацию белка 7—10 мг/мл (всего около 100 мл); рН раствора должен быть около 6,5. К раствору белка добавляют НАД⁺ в конечной концентрации 1 мМ; добавление НАД⁺ целесообразно, если раствор имеет $A_{280}/A_{260} > 1,1$. Доводят рН раствора до 7,0 разведенным аммиаком и добавляют к нему сухой сульфат аммония из расчета 50 г на 100 мл. Кристаллизация завершается в течение 5 дней. Кристаллы хранят в виде суспензии в полунасыщенном растворе сульфата аммония в присутствии 20 мМ дитиотрептола при 2—4°C.

Получение апофермента. Для отщепления НАД⁺, прочно связанного с мышечной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, препарат фермента обрабатывают норитом (активированный уголь), 500 мг норита суспендируют в 10 мл 10 мМ фосфата натрия, содержащего 5 мМ ЭДТА, рН 7,2. Через 2—3 мин надосадочную жидкость декантируют для удаления мелких частиц норита. Эту процедуру повторяют 2—3 раза, после чего осадок норита отделяют центрифугированием (1000 g, 4 мин). К влажному осадку норита добавляют 1,5 мл раствора фермента (концентрация белка 10—20 мг/мл). Суспензию перемешивают 1 мин, затем норит отделяют центрифугированием, а раствор белка пропускают через колонку с сефадексом G-50, уравновешенную 10 мМ фосфатом натрия, 5 мМ ЭДТА, рН 7,2.

Выделение глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из пекарских дрожжей

Реактивы:

1. ЭДТА — 5 мМ раствор, рН 7,5.

2. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
3. Сульфат аммония — насыщенный раствор, рН 8,2.
4. Сульфат аммония — 2,4 М раствор, рН 7,5.
5. Толуол.
6. Аммиак.

Все растворы готовят на 5 мМ растворе ЭДТА, приготовленном на бидистиллированной воде.

Экстракция. В колбу объемом 3 л, содержащую 600 мл нагретого до 40°С толуола, добавляют 1 кг измельченных свежих пекарских дрожжей. Смесь инкубируют на водяной бане при 45°С до разжижения, периодически помешивая, и затем оставляют при комнатной температуре. Через 3 ч переливают смесь в толстостенный стакан объемом 5 л, добавляют 1 л охлажденного 5 мМ раствора ЭДТА (рН 7,5), перемешивают и оставляют на 16 ч при 3°С (стакан необходимо плотно закрыть крышкой для уменьшения испарения толуола). Всю последующую работу проводят в холодной комнате или на ледяной бане.

С помощью сифона отделяют нижний слой жидкости, представляющий собой дрожжевой экстракт. Его вначале центрифугируют (5000 g, 60 мин), а затем фильтруют на воронке Бухнера большого диаметра через плотный слой мезги. Мезгу готовят следующим образом. Мелко нарезанную фильтровальную бумагу заливают бидистиллированной водой и гомогенизируют, после чего полученную кашицу уплотняют на воронке Бухнера, отсасывая воду, а затем промывают 5 мМ раствором ЭДТА.

Фракционирование сульфатом аммония. К прозрачному желтому фильтрату добавляют небольшими порциями (в течение 1 ч) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке мелкоизмельченный сульфат аммония до насыщения 0,5 (314 г на каждый литр экстракта). Небольшой осадок удаляют центрифугированием. Центрифугат доводят до насыщения 0,7 добавлением 135 г сульфата аммония на каждый литр раствора и оставляют на 10—15 ч при 3°С. Затем осадок отделяют центрифугированием или фильтрованием с отсасыванием.

Кристаллизация. Осадок растворяют в 5 мМ ЭДТА (рН 7,5) до достижения концентрации белка 15—30 мг/мл. Полученный желто-коричневый раствор доводят до слабого помутнения осторожным добавлением (по каплям с помощью делительной воронки) насыщенного раствора сульфата аммония, рН которого предварительно доведен до 8,2 концентрированным аммиаком. Необходимый объем раствора сульфата аммония примерно равен 2/3 объема воды, использованной для растворения осадка, рН раствора доводят до 8,2 добавлением 4%-ного NH_4OH . Кристаллизация начинается через 10—15 мин и заканчивается через 2—3 дня. Кристаллы отделяют центрифугированием при 15 000 g.

Перекристаллизация. Осадок растворяют в 5 мМ ЭДТА (рН 7,5) до достижения концентрации белка 20—30 мг/мл. Раствор доводят до слабого помутнения добавлением насыщенного раствора сульфата аммония; рН доводят до 8,2 разведенным аммиаком. Через 2—3 дня кристаллы отделяют центрифугированием. Определяют активность. Перекристаллизацию следует повторить 2—3 раза. При кристаллизации и перекристаллизации иногда образуется осадок, не обладающий активностью. В случае выпадения неактивного осадка его отделяют центрифугированием, а супернатант вновь доводят до помутнения добавлени-

ем насыщенного раствора сульфата аммония. Фермент хранят при 2—4°С в виде суспензии кристаллов в 2,4 М растворе сульфата аммония.

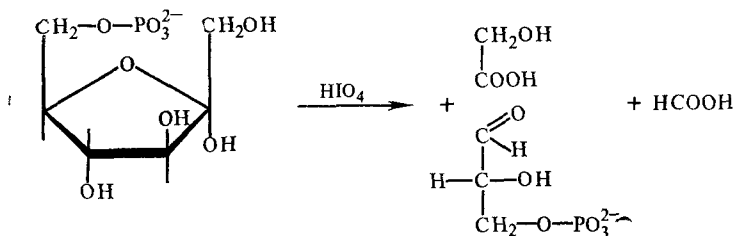
ЛИТЕРАТУРА

1. Harris J. I., Waters M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase//The Enzymes. N. Y., 1976. Vol. 13. P. 1.
2. Harris J. I., Perham R. N. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. 1. The protein chains in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle//J. Mol. Biol. 1965. Vol. 13. P. 876.
3. Conway A., Koshland D. E. Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase//Biochemistry. 1968. Vol. 7. P. 4011.
4. Buehner M., Ford G. C., Moras D. et al. Structure determination of crystalline lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase//J. Mol. Biol. 1974. Vol. 90. P. 25.

11. ПОЛУЧЕНИЕ ТРИОЗОФОСФАТОВ

Химический синтез 3-фосфоглицеринового альдегида

Метод основан на окислении фруктозо-6-фосфата йодной кислотой.



Реактивы:

1. Фруктозо-6-фосфорная кислота, бариевая соль.
2. Дауэкс-50 в H⁺-форме.
3. Йодная кислота (HIO₄·2H₂O) — 1 М раствор (готовят непосредственно перед употреблением).
4. Этиленгликоль.
5. NaOH — 2 н. раствор.
6. Этиловый спирт перегнанный, 96- и 50%-ный.
7. Уксуснокислый кальций — 1 М раствор.

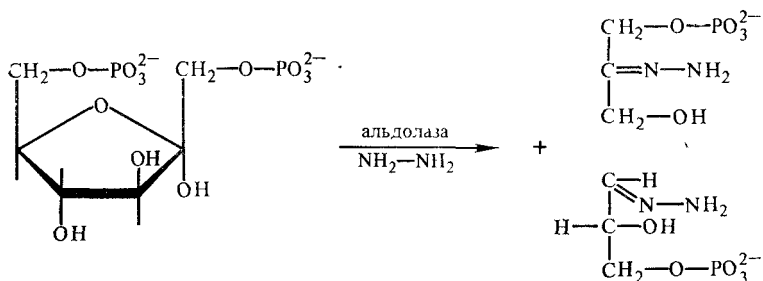
К навеске бариевой соли фруктозо-6-фосфата, необходимой для приготовления 50 мл 0,1 М раствора, приливают 35—40 мл воды и добавляют смолу Дауэкс-50 в H⁺-форме для удаления ионов Ba²⁺. Полноту удаления контролируют в отдельной пробе с сульфатом аммония. Смолу отделяют фильтрованием и промывают, соединяя промывные воды с основным раствором. Объем доводят до 50 мл. Затем раствор охлаждают до 0°С, добавляют к нему 17,5 мл свежеприготовленного охлажденного 1 М раствора йодной кислоты. Через 15 мин добавляют по каплям 1,5 мл этиленгликоля (для разложения избытка йодной кислоты) и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем раствор нейтрализуют до pH 7,0 с помощью 2 н. NaOH, добавляя 96%-ный этиловый спирт в количестве, равном объему раствора, и оставляют при 0°С на 3 ч. Образовавшиеся кристаллы йодистого натрия

тщательно удаляют фильтрованием. К фильтрату добавляют 14 мл 1 М раствора уксуснокислого кальция, 14 мл 96%-ного этилового спирта и оставляют на 3 ч при 4° С. Осадок кальциевой соли 3-фосфоглицеринового альдегида отделяют центрифугированием, промывают 3 раза 50%-ным и 1 раз 96%-ным спиртом, сушат в вакуум-экссикаторе над хлористым кальцием (для более быстрого высушивания после промывания спиртом осадок можно 1 раз промыть диэтиловым эфиром). Получают препарат ($C_3H_5O_6P_{Ca} \cdot 2H_2O$) 50—65%-ной чистоты.

Кальциевую соль 3-фосфоглицеринового альдегида хранят в эксикаторе над хлористым кальцием при 0° С. Перед употреблением ионы кальция удаляют с помощью смолы Дауэкс-50. Для этого к 50—80 мг кальциевой соли альдегида добавляют 20—400 мг смолы и 3—4 мл воды. Смесь перемешивают до растворения вещества, а затем фильтруют. Концентрацию 3-фосфоглицеринового альдегида определяют энзиматически с использованием глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

Получение смеси 3-фосфоглицеринового альдегида и фосфодиоксиацетона путем энзиматического расщепления фруктозо-1,6-дифосфата

Метод основан на расщеплении фруктозо-1,6-дифосфата альдолазой в присутствии гидразина. После разложения образующихся гидразонов бензальдегидом получают раствор свободных фосфотриоз, содержащий эквимольные количества 3-фосфоглицеринового альдегида и фосфодиоксиацетона.



Реактивы:

1. Кристаллическая альдолаза.
2. Фруктозо-1,6-дифосфат (освобожденный от ионов Ba^{2+} или Ca^{2+}) — 0,07 М раствор, pH 7,5.
3. $NaHCO_3$ — 5%-ный (готовят непосредственно перед употреблением).
4. Гидразин солянокислый (доводят до pH 7,0) — 2 М раствор.
5. Кальций уксуснокислый — 1 М раствор.
6. Бензальдегид.
7. Этиловый спирт, ацетон, эфир.

Получение гидразонов фосфотриоз. В эрленмейеровской колбочке смешивают 25 мл 0,07 М раствора фруктозо-1,6-дифосфата (pH 7,5), 10 мл 5%-ного раствора $NaHCO_3$, 6 мл раствора гидразина и 30 мл водного раствора альдолазы, содержащих 100 единиц активности, pH

Смесь должна быть густой. Смесь инкубуют при 37°С в течение 30 мин, после чего в нее добавляют еще 20 мл раствора альдозазы (50 единиц активности) и 4 мл раствора гидразина. Инкубация продолжается еще 30 мин. За ходом расщепления фруктозодифосфата можно следить по убыли фруктозы. Реакцию останавливают добавлением трихлоруксусной кислоты в конечной концентрации 5%. Осадок белка удаляют центрифугированием.

Получение свободных фосфотриоз. Центрифугат сливают в делительную воронку и встряхивают с 20 мл бензальдегида. Слой бензальдегида сливают и встряхивание повторяют еще 3 раза. Затем бензальдегид удаляют 4-кратной экстракцией равным объемом эфира. К полученному раствору (раствор фосфотриоз можно хранить в замороженном состоянии в течение 7—12 дней) добавляют 10 мл 1 М раствора уксуснокислого кальция и 30 мл 95%-ного этилового спирта. Выпавший осадок отделяют центрифугированием. К центрифугату добавляют 20 мл 95%-ного этилового спирта и 200 мл ацетона, оставляют на ночь в холодильнике. Осадок собирают центрифугированием, промывают 95%-ным спиртом, затем эфиром, высушивают в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием и хранят в эксикаторе при 0—4°С. Для освобождения от ионов кальция используют смолу Дауэкс-50 в H⁺-форме.

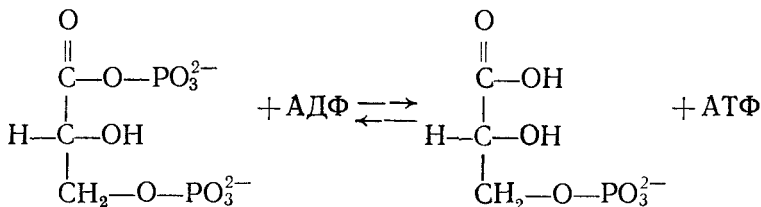
ЛИТЕРАТУРА

1. Szewczuk A., Wolny E., Wolny M. et al. Nowa metoda otrzymywania D-glyceraldehyde-3-fosfoanu//Acta Biochem. Polon. 1961. Vol. 8. P. 201.
2. Meyerhof O., Junowicz-Kocholaty R. The equilibria of isomerase and aldolase and the problem of the phosphorylation of glyceraldehyde phosphate//J. Biol. Chem. 1943. Vol. 149. P. 71.

12. 3-ФОСФОГЛИЦЕРАТКИНАЗА

(АТФ: 3-фосфо-D-глицерат-1-фосфотрансфераза, КФ 2.7.2.3)

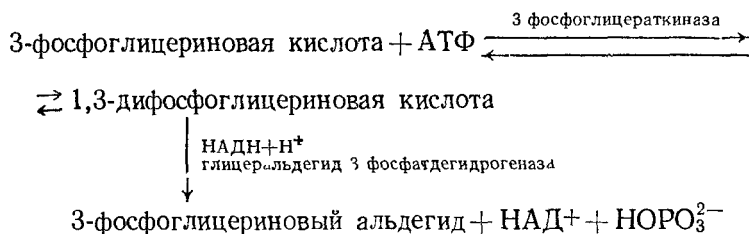
3-Фосфоглицераткиназа катализирует реакцию переноса фосфатной группы, находящейся в первом положении в молекуле 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицериновой кислоты.



Молекулярная масса 3-фосфоглицераткиназы равна 47 000 Да; фермент представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из 420 аминокислотных остатков. 3-Фосфоглицераткиназа из мышц кролика содержит семь SH-групп. Она ингибируется ионами тяжелых металлов и SH-реагентами, тогда как фермент из дрожжей имеет лишь одну SH-группу, модификация которой не влияет на активность. Ионы Mg²⁺ и Mn²⁺ являются активаторами. Константы Михаэлиса для 3-фосфоглицерата — 0,2 мМ, для 1,3-дифосфоглицерата — 1,8 мкМ, для АТФ — 0,1 мМ; для АДФ — 0,2 мМ; для Mg²⁺ — 0,2 мМ.

Определение активности 3-фосфоглицераткиназы

Активность 3-фосфоглицераткиназы определяют в сопряженной системе, используя в качестве вспомогательного фермента *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, катализирующую реакцию восстановления дефосфорилирования 1,3-дифосфоглицериновой кислоты:



Скорость реакции измеряют по уменьшению поглощения при 340 нм.

Реактивы:

1. Триэтаноламиновый буфер — 100 мМ раствор, рН 7,5.
2. НАДН — 6 мМ раствор.
3. АТФ — 0,12 М раствор.
4. 3-фосфоглицериновая кислота — 0,3 М раствор.
5. MgSO_4 — 0,2 М раствор.
6. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Кристаллическую суспензию растворяют в 5 мМ ЭДТА (рН 7,5) до получения раствора, содержащего 50 единиц активности (0,1 мл) (см. также с. 208).

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

Реакционная смесь должна содержать следующие компоненты (указаны конечные концентрации): 80 мМ триэтаноламиновый буфер (рН 7,5), 10 мМ MgSO_4 , 0,2 мМ НАДН, 4 мМ АТФ, 10 мМ 3-фосфоглицериновую кислоту и 10 ед. акт/мл глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Реакцию начинают добавлением 30—50 мкл раствора 3-фосфоглицераткиназы.

Определение белка проводят спектрофотометрически при 280 нм, учитывая, что $A_{1\%}^{1\text{см}} = 5,7$ (фермент из мышц кролика) и 5,3 (фермент из пекарских дрожжей).

Выделение и очистка 3-фосфоглицераткиназы из скелетных мышц кролика

Метод I

Реактивы:

1. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
2. Сульфат аммония — 0,1 М раствор, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, рН 6,0.
3. Натрий-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,6, содержащий 10 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол.

4. Триэтаноламиновый буфер — 0,05 М раствор, рН 7,6, содержащий 2,0 М сульфат аммония и 1 мМ дитиотреитол.
5. Триэтаноламиновый буфер — 10 мМ раствор, рН 8,0, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол.
6. ЭДТА — 10 мМ раствор, содержащий 1 мМ дитиотреитол, рН 7,6.
7. Сефадекс G-75.
8. ДЭАЭ-сефадекс А-25.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде; работу проводят при 2—4° С.

Экстракция. Измельченную мышечную массу (500 г) (с 221) суспендируют в пяти объемах 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6), содержащего 10 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол. После 60-минутного перемешивания механической мешалкой суспензию центрифугируют (20 мин при 10 000 g).

Фракционирование сульфатом аммония. К экстракту медленно, при помешивании, добавляют мелкоизмельченный сульфат аммония до достижения концентрации 2,6 М и оставляют на ночь на холоде. Осадок отделяют центрифугированием (40 мин при 15 000 g) и к супернатанту добавляют сульфат аммония до концентрации 3,2 М. После стояния в течение 1 ч осадок собирают центрифугированием (40 мин при 15 000 g) и используют для дальнейшей работы.

Тепловая обработка. Около 1/4 всего количества осадка растворяют в 0,05 М триэтаноламиновом буфере, рН 7,6, содержащем 2,0 М сульфат аммония и 1 мМ дитиотреитол, до достижения концентрации белка 40 мг/мл и инкубируют в водяной бане при 50° С в течение 5 мин. Затем быстро охлаждают в ледяной бане и денатурировавшие белки удаляют центрифугированием при 15 000 g в течение 40 мин. Белок из раствора осаждают добавлением сульфата аммония до 3,2 М концентрации, центрифугируют (40 мин при 15 000 g) и осадок растворяют в 10 мМ ЭДТА, содержащем 1 мМ дитиотреитол (рН 7,6). Проводят диализ против того же раствора. После диализа концентрация белка должна составлять 50—60 мг/мл. Этот раствор используют для дальнейшей очистки фермента.

Гель-фильтрация. Готовят колонку (20×40 см), заполненную сефадексом G-75 и уравновешенную 0,1 М сульфатом аммония, содержащим 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, рН 6,0. На колонку наносят около 2 мл раствора белка и пропускают раствор, используемый для уравновешивания колонки. Анализируют фракции элюата, определяя в них содержание белка и активность фермента. Собирают и объединяют фракции, содержащие наибольшее количество активного белка. Гель-фильтрацию можно повторить на той же колонке с новыми порциями раствора белка. Объединенные элюаты концентрируют путем осаждения белка сульфатом аммония (конечная концентрация — 3,2 М). Осадок растворяют в небольшом объеме 10 мМ триэтаноламинового буфера, рН 8,0, содержащего 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, и диализуют против того же буфера.

Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе. Готовят колонку (1,5×40 см), заполненную ДЭАЭ-сефадексом А-25. Колонку уравновешивают указанным выше буфером. Наносят раствор белка (около 100 мг в 3 мл) и проводят элюцию тем же буфером, определяя во фракциях элюата содержание белка и активность фермента. Фракции, содержащие наибольшую активность, объединяют и добавляют к ним сульфат аммония до концентрации 3,0 М. Доводят рН до 6,0. При этом около 90%

фермента выпадает в виде аморфного осадка. Периодическое (в течение нескольких часов) повышение температуры до 23°С приводит к постепенному превращению аморфного осадка в кристаллический.

Метод II

Реактивы:

1. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
2. Фосфат калия — 30 мМ раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, рН 7,0.
3. Ацетат натрия — 0,1 М раствор, доведенный уксусной кислотой до рН 5,6.
4. Трис — 1 М раствор.
5. Трис — 10 мМ раствор.
6. ЭДТА — 0,2 М раствор, доведенный 1 М трисом до рН 7,0.
7. ЭДТА — 0,2 М раствор, доведенный 1 М трисом до рН 7,5—7,8.
8. Трис — 1 М раствор, доведенный морфолиноэтансульфоновой кислотой (MES) до рН 6,5.
9. Трис — 10 мМ раствор, доведенный MES до рН 6,5.
10. КОН — 10 мМ раствор, доведенный трицином до рН 7,9 и содержащий 3 мМ ацетат натрия.
11. КОН — 10 мМ раствор, доведенный трицином до рН 7,9 и содержащий 0,5 мМ 3-фосфоглицерат.
12. Сульфат аммония — насыщенный раствор, содержащий 30 мМ имидазол, 5 мМ ЭДТА и 2 мМ дитиотреитол, рН 7,0.
13. Имидазол — 30 мМ раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА и 2 мМ дитиотреитол, рН 7,0.
14. Сефадекс G-50.
15. КМ-целлюлоза.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Всю работу проводят при 2—4°С.

Экстракция. Измельченную мышечную массу (с. 291) заливают тремя объемами раствора экстракции: 30 мМ фосфата калия, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, рН 7,0, и гомогенизируют 2—3 мин, после чего гомогенат сразу же центрифугируют (30 мин при 10 000 g).

Фракционирование сульфатом аммония. К прозрачному супернатанту медленно добавляют сульфат аммония (40 г на 100 мл). После добавления последней порции раствор перемешивают в течение часа и вновь центрифугируют (30 мин при 20 000 g). Осадок отбрасывают, а к супернатанту снова добавляют сульфат аммония (11,6 г на 100 мл). Спустя час после добавления последней порции центрифугируют (30 мин при 20 000 g). Полученный осадок используют для дальнейшей очистки фермента.

Тепловая обработка. Осадок растворяют в минимальном объеме 0,1 М ацетата натрия, доведенного уксусной кислотой до рН 5,6. Полученный раствор подвергают нагреванию в течение 10 мин при 45°С. Тепловую обработку проводят непосредственно в центрифужном стакане, после чего пробу быстро охлаждают до 0°С. Денатурировавший белок удаляют центрифугированием (30 мин при 20 000 g).

Обессоливание. В прозрачном супернатанте доводят рН до 7,0 1 М раствором триса и наносят раствор белка на колонку с сефадексом

G-50 для обессоливания (размер колбнки 4×40 см). Предварительно колонку уравнивают 0,2 М ЭДТА, доведенным 1 М раствором триса до pH 7,5—7,8. В обессоленных фракциях определяют активность 3-фосфоглицераткиназы. Выход соли с колонки регистрируют пробой с ацетатом бария. Необходимо следить, чтобы белковые фракции были тщательно обессолены, так как примесь сульфата в растворе не позволит «посадить» белок на ионообменник (с. 108).

Хроматография на КМ-целлюлозе и кристаллизация. 5 мл 1 М раствора триса доводят сухим MES до pH 6,5 ($\pm 0,1$) и добавляют этот раствор в обессоленные белковые фракции с таким расчетом, чтобы конечная концентрация триса составила 10 мМ. Затем раствор белка наносят на колонку (3×4 см) с КМ-целлюлозой, уравновешенную 10 мМ трисом, доведенным сухим MES до pH 6,5 ($\pm 0,1$). После нанесения белка на ионообменник колонку промывают 50—100 мл буфера (10 мМ трис-MES, pH 6,5), а затем начинают промывать колонку буфером: 10 мМ КОН, доведенный трицином до pH 7,9 ($\pm 0,1$) и содержащий 3 М ацетат натрия. Скорость тока через колонку следует установить около 200 мл/ч; по мере связывания белка на колонке скорость тока может значительно упасть; в этом случае можно увеличить давление, подаваемое на колонку, с помощью перистальтического насоса.

При связывании фермента на колонке при pH адсорбции 6,5 в верхней части ионообменника образуется ярко-красное кольцо мышечных белков, а по мере заполнения колонки белком целлюлоза приобретает опаловую, бледную желтизну. Граница раздела между матовой и желтовато-опаловой зонами постепенно продвигается книзу. После подачи на колонку буфера pH 7,9 (КОН-трицин) красное кольцо мышечных белков начинает постепенно двигаться книзу, разделяясь при этом на несколько отдельных колец и прокрашивая целлюлозу в бледно-розовый цвет. Необходимо дожидаться выхода этого материала с колонки (для этого через колонку должно пройти 6—10 объемов колонки буфера, pH 7,9). После того как поглощение при 280 нм в элюате снизится до значения 0,1—0,2, на колонку подают буфер (10 мМ КОН-трицин, pH 7,9), содержащий вместо 3 мМ ацетата натрия 0,5 мМ 3-фосфоглицерат. Фермент выходит резким пиком (в максимуме — несколько единиц оптической плотности) с фронтом субстрата и тянет-ся небольшим «хвостом».

Фракции, содержащие 3-фосфоглицераткиназу, объединяют и добавляют сухой сульфат аммония, доводя раствор до помутнения. Фермент кристаллизуется в течение нескольких дней. Кристаллы отделяют центрифугированием и растворяют их в небольшом объеме буфера: 30 мМ имидазол, содержащий 5 мМ ЭДТА и 2 мМ дитиотреитол, pH 7,0. Медленным добавлением сухого сульфата аммония доводят раствор до помутнения. Кристаллы хранят в виде суспензии в насыщенном растворе сульфата аммония, содержащем 30 мМ имидазол, 5 мМ ЭДТА и 2 мМ дитиотреитол, pH 7,0.

Выделение фермента из пекарских дрожжей

Реактивы:

1. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
2. Сульфат аммония, насыщенный раствор.
3. NH_4OH — 0,5 М раствор, содержащий 1 г ЭДТА/л.
4. Калий-фосфатный буфер — 20 мМ раствор, pH 6,5.

5. ЭДТА — 1 мМ раствор, рН 7,0.
 6. Молочная кислота — 5 М раствор, доведенный аммиаком до рН 3,5.
 7. Молочная кислота — 0,5 М раствор.
 8. Трис — 40 мМ раствор, содержащий 1 мМ ЭДТА.
 9. Трис — 1 М раствор.
 10. Протаминсульфат — 2%-ный раствор, доведенный трисом до рН 7,0.
 11. Какодиловая кислота — 1 М раствор.
 12. Трис — 10 мМ раствор, содержащий 1 мМ ЭДТА, доведенный до рН 6,0 какодиловой кислотой.
 13. NaCl — 0,15 М раствор, содержащий 1 мМ ЭДТА и 10 мМ имидазол, рН 7,0.
 14. КМ-целлюлоза.
 15. Сефадекс G-25.
 16. Сефадекс G-100.
- Всю работу проводят при комнатной температуре.

Экстракция. Цитолиз дрожжей осуществляют путем инкубации в растворе аммиака. К литру 0,5 М NH_4OH , содержащего 1 г ЭДТА, при интенсивном перемешивании медленно добавляют 450 г высушенных дрожжей. Эта процедура занимает 30 мин. Образующиеся сгустки размельчают и перемешивание продолжают в течение нескольких часов; студнеобразную массу оставляют на ночь. На следующий день перемешивание продолжают; всего оно должно осуществляться в течение 20—24 ч с момента добавления дрожжей. Затем к суспензии добавляют 800 мл 0,5 М молочной кислоты. Доводят рН до $7,0 \pm 0,5$ холодной 5 М молочной кислотой, доведенной до рН 3,5 аммиаком. Смесь центрифугируют при 20 000 g в течение 15 мин, осадок отбрасывают. Полученный экстракт содержит многие растворимые ферменты. Его можно использовать для выделения глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, гексокиназы, а также 3-фосфоглицераткиназы.

Фракционирование сульфатом аммония. К экстракту медленно добавляют сульфат аммония (100 г/л). Доводят рН до 4,3 холодным раствором 5 М лактата аммония, рН 3,5, как описано выше. Для этого требуется около 50 мл лактата аммония. Во время этой процедуры необходимо тщательное перемешивание. После стояния в течение 10 мин при рН 4,3 смесь центрифугируют (15 мин при 20 000 g), осадок отбрасывают. Снова добавляют сульфат аммония (250 г/л); процесс ведут медленно, в течение 15 мин при перемешивании. После 30-минутного стояния смесь центрифугируют, как описано выше. Супернатант отбрасывают. Осадок растворяют в 800 мл 40 мМ раствора триса, содержащего 1 мМ ЭДТА. Если необходимо, добавляют 1 М трис для доведения рН до $7,5 \pm 0,2$. К полученному раствору добавляют при перемешивании в течение 15 мин 340 г сульфата аммония на 1 л. После 30-минутного стояния смесь центрифугируют, осадок отбрасывают. Снова добавляют сульфат аммония (150 г/л), образующийся осадок собирают центрифугированием, как указано выше. Этот осадок растворяют в небольшом объеме 1 мМ ЭДТА, рН 7,0.

Обессоливание. Раствор обессоливают перед нанесением на колонку с КМ-целлюлозой. Это можно осуществить либо диализом, либо гель-фильтрацией через большую колонку с сефадексом G-25. Диализ следует проводить против проточной воды в течение по крайней мере 3 ч, и затем в течение ночи против 5 л 1 мМ ЭДТА, рН 7,0. Утром бу-

фер нужно сменить и продолжить диализ еще в течение нескольких часов.

Хроматография на КМ-целлюлозе. К раствору белка добавляют раствор протаминсульфата (1 г/50 мл воды), доведенный трисом до рН 7,0. Полученный осадок удаляют центрифугированием. Затем к супернатанту добавляют 0,01 объема 1 М раствора триса и понижают рН до 6,0 с помощью 1 М какодиловой кислоты. Разводят раствор до 800 мл добавлением 10 мМ триса, содержащего 1 мМ ЭДТА (рН 6,0, доведено какодиловой кислотой), и наносят его на колонку (4,5×30 см) с КМ-целлюлозой, уравновешенную 10 мМ трисом, 1 мМ ЭДТА, доведенным до рН 6,0 какодиловой кислотой. После нанесения белка на колонку начинают элюцию линейным градиентом КСl. Для создания градиента используют два сосуда, один из которых содержит 1 л буфера, а другой — 1 л буфера, приготовленного на 0,2 М КСl. Скорость тока — 120 мл/ч. Фракции, содержащие более 300 единиц активности фермента в 1 мл, объединяют.

Концентрирование и гель-фильтрация. К раствору медленно, при перемешивании, добавляют 600 г сульфата аммония на 1 л. После 30-минутного стояния осадок собирают центрифугированием (30 мин при 20 000 g) и растворяют в небольшом объеме воды. Доводят раствор до объема 40—50 мл, нерастворившийся осадок отделяют центрифугированием. Половину центрифугата наносят на колонку с сефадексом G-100 (3×110 см), уравновешенную 0,15 М NaCl, содержащим 1 мМ ЭДТА и 10 мМ имидазол, рН 7,0. Элюцию проводят в течение 8—10 ч со скоростью тока 30—40 мл/ч. Аналогичным образом обрабатывают вторую половину раствора.

Кристаллизация. Фракции, содержащие активность фермента, объединяют и добавляют к ним медленно, при перемешивании, 600 г/л сульфата аммония. После 30-минутного стояния осадок отделяют центрифугированием и растворяют в 20 мМ калий-фосфатном буфере, рН 6,5 до достижения концентрации белка 20—30 мг/мл. К раствору медленно добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до помутнения. Кристаллизация проходит при комнатной температуре и заканчивается через несколько дней.

ЛИТЕРАТУРА

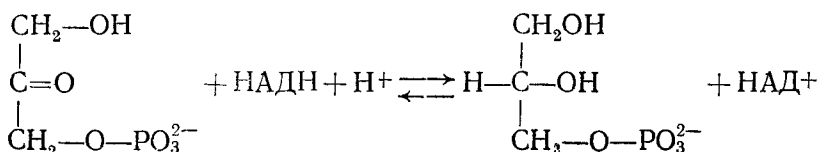
1. Banks R. D, Blake C. C. F., Evans P. R. et al. Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase a possible hinge-bending enzyme//Nature 1979. Vol. 279. P. 773.
2. Krietsch W. K., Bücher T. 3-Phosphoglycerate Kinase from rabbit skeletal muscle and yeast//Eur. J. Biochem. 1970. Vol. 17. P. 568.
3. Fifis T., Scopes R. K. Purification of 3-Phosphoglycerate Kinase from diverse sources by affinity elution chromatography//Biochem J 1978. Vol. 175. P. 311.
4. Scopes R. K. The steady-state kinetics of yeast Phosphoglycerate Kinase//Eur. J. Biochem. 1978. Vol. 85. P. 503.

1.

13. ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА

(L-глицерол-3-фосфат: НАД⁺-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.8)

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа катализирует реакцию восстановления фосфодиоксиацетона в глицерол-3-фосфат:



Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа — димер, состоящий из одинаковых субъединиц. Молекулярная масса фермента из мышц кролика составляет 78000 Да. Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа угнетается SH-реактантами, а также ионами тяжелых металлов. Константы Михаэлиса для НАДН — 11,9 мкМ, глицерол-3-фосфата — 0,18 мМ, НАД⁺ — 0,012 мМ, фосфодиоксиацетона — 0,2 мМ. АМФ, АДФ, АДФ-рибоза являются коэнзим-конкурентными ингибиторами.

Определение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы

Активность фермента определяют спектрофотометрически, измеряя убыль или нарастание НАДН в ходе реакции.

Реактивы:

1. Трис-НСl буфер — 0,1 М раствор, рН 7,8, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол.
2. Пирофосфатный буфер — 0,05 М раствор, рН 9,0, содержащий 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол.
3. Гидразин — 0,6 М раствор.
4. Фосфодиоксиацетон — 18 мМ раствор (либо раствор смеси фосфотриоз).
5. НАДН — 3,6 мМ раствор.
6. НАД⁺ — 3,6 мМ раствор.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

А. Реакция восстановления фосфодиоксиацетона

В спектрофотометрическую кювету помещают 0,1 М трис-НСl буфер, рН 7,8 (2,5 мл), фосфодиоксиацетон (конечная концентрация — 3 мМ) и НАДН (конечная концентрация — 0,12 мМ). Объем пробы доводят до 3 мл. Реакцию начинают добавлением 30—50 мкл раствора фермента. Измеряют уменьшение поглощения при 340 нм.

Б. Реакция окисления глицерол-3-фосфата

В спектрофотометрическую кювету помещают 0,05 М пирофосфатный буфер рН 9,0 (2,5 мл), гидразин (конечная концентрация — 20 мМ), глицерол-3-фосфат (конечная концентрация — 1,8 мМ), НАД⁺ (конечная концентрация — 1,2 мМ). Объем пробы доводят до 3 мл. Реакцию начинают добавлением 30—50 мкл раствора фермента. Измеряют нарастание поглощения при 340 нм. Определение белка проводят спектрофотометрически, учитывая, что при 280 нм $A_{1\%}^{1\text{см}} = 7,4$.

Исследование свойств фермента см. на с. 206.

Выделение фермента из скелетных мышц кролика

Реактивы:

1. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
2. Сульфат аммония — 1,4 М раствор, рН 5,7.
3. Сульфат аммония — 1,9 М раствор, рН 5,7.

Всю работу проводят в холодной комнате. Растворы готовят на бидистиллированной воде, содержащей 5 мМ ЭДТА и 0,2 мМ дитиотреитол, рН 7,0.

Экстракция. Измельченную мышечную массу (с. 221) заливают двойным объемом воды с ЭДТА и экстрагируют в течение 30 мин. Экстракт отделяют центрифугированием (30 мин, 10 000 g). Экстракцию повторяют, залив мышечную массу половинным объемом воды.

Фракционирование сульфатом аммония. Измеряют объем соединенных экстрактов и начинают медленное добавление мелко измельченного сульфата аммония из расчета 275 г/л. При этом достигается концентрация 1,7 М. Для доведения рН до 5,8 используют разбавленные растворы аммиака и H_2SO_4 . Через 2 ч осадок отделяют центрифугированием (10 мин, 10 000 g) и отбрасывают. К супернатанту вновь осторожно добавляют сульфат аммония до конечной концентрации 2,4 М (примерно 106 г/л). Аморфный осадок белков (фракцию 1,7 М — 2,4 М сульфата аммония) отделяют центрифугированием (15 мин, 10 000 g). Эта фракция содержит альдолазу, глицерол-3-фосфатдегидрогеназу, пируваткиназу и лактатдегидрогеназу. Влажный осадок растворяют в полуторакратном по объему количестве воды с ЭДТА, что снижает концентрацию сульфата аммония приблизительно до 0,8 М. К раствору белка (65 мг/мл) медленно добавляют сухой сульфат аммония до достижения концентрации последнего 1,4 М, рН доводят до 6,1.

При стоянии в течение ночи образуются кристаллы, которые отделяют центрифугированием (20 мин, 10 000 g). К супернатанту, содержащему сульфат аммония в концентрации 1,4 М, медленно добавляют сульфат аммония до 1,75 М концентрации (доводят аммиаком до рН 6,1). Раствор стоит ночь на холоде, при этом начинается образование гексагональных кристаллов альдолазы (за которым можно следить, рассматривая каплю суспензии под микроскопом). Молярность сульфата аммония доводят до 1,82, контролируя рН (он должен быть равен 6,1). Кристаллизация альдолазы происходит в течение 24—36 ч.

Кристаллы отделяют центрифугированием, когда в супернатанте остается меньше 25% альдолазной активности (определение см. на с. 246). Чем полнее отделена альдолаза, тем лучше удастся выделение глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Если глицерол-3-фосфатдегидрогеназа начинает кристаллизоваться на этом этапе (ее кристаллы имеют форму игл или пластинок), нужно быстро и на малой скорости отцентрифугировать осадок альдолазы так, чтобы более легкие кристаллы дегидрогеназы остались в супернатанте. Контроль за формой кристаллов осуществляют с помощью микроскопа.

Кристаллизация. К раствору, содержащему глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (фракция 1,82 М сульфата аммония, рН 6,1—6,2), добавляют медленно, в течение трех дней, сухой сульфат аммония до повышения его молярности до 2,0 М.

Появляются кристаллы с шелковистым блеском. Их отделяют центрифугированием и суспендируют в 1,9 М сульфате аммония (фракция 1). К супернатанту медленно (в течение 2—3 сут) добавляют сульфат аммония до достижения концентрации 2,1 М (рН 6,2). При этом кристаллизуется основная масса глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Осадок отделяют центрифугированием и суспендируют в 1,9 М сульфате аммония (фракция 2). В супернатанте медленным (в течение нескольких дней) добавлением сульфата аммония молярность повышают до 2,3. Осадок отделяют центрифугированием и также суспендируют в 1,9 М растворе сульфата аммония (фракция 3).

Фракции 1 и 3 соединяют, суспендируют в 1,75 М сульфате аммония и нагревают в течение 4 ч до 25—30° С. Это приводит к растворению кристаллов альдолазы, загрязняющих препарат. Центрифугируют, осадок промывают 1,85 М раствором сульфата аммония и соединяют с фракцией 2. Дальнейшая очистка заключается в промывании осадка 1,85 М раствором сульфата аммония, при этом концентрация белка в растворе не должна быть ниже 20 мг/мл. Для перекристаллизации препарат растворяют в холодном растворе ЭДТА (концентрация белка 20—30 мг/мл), денатурировавший белок отделяют центрифугированием и к супернатанту добавляют сухой сульфат аммония до слабого помутнения. Кристаллизация завершается при достижении концентрации сульфата аммония, равной 1,85 М.

В ходе выделения фермента необходимо постоянно контролировать молярность сульфата аммония. Это осуществляют путем колориметрического определения концентрации иона NH_4^+ с реактивом Несслера (с. 87).

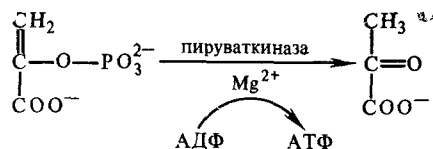
ЛИТЕРАТУРА

1. Baranowski T. α -Glycerophosphate dehydrogenase//The Enzymes. N. Y., 1963. Vol. 7. P. 85.
2. Beisenherz G., Boltze H. J., Bücher T. et al. Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyde Dehydrogenase, Milchsäure Dehydrogenase, Glycerophosphate Dehydrogenase und Pyruvat Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang//Z. Naturforsch., 1953. Bd 8 b. S. 555.
3. Kim S. J., Anderson B. M. Coenzyme binding to L-glycerophosphate dehydrogenase//J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244. P. 1547.
4. Fondy T. P., Ross C. R., Sollohub S. J. Structural studies on rabbit muscle glycerol-3-phosphate dehydrogenase and a comparison of chemical and physical determinations of its molecular weight//J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244. P. 1631.
5. Apitz-Castro R., Suarez Z. Structural studies on the active centre of α -glycerophosphate dehydrogenase//Biochem. Biophys. acta. 1970. Vol. 198. P. 176.

14. ПИРУВАТКИНАЗА

(АТФ: пируват-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.40)

Пируваткиназа катализирует необратимую реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват, сопровождающуюся образованием АТФ:



Реакция протекает с выделением энергии ($\Delta G^{\circ} = -7,5$ ккал/моль).

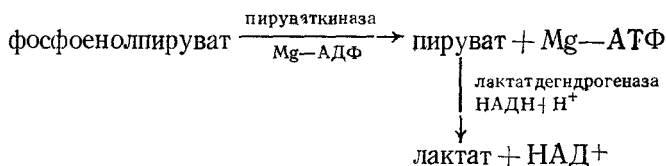
В тканях млекопитающих известны три изозима пируваткиназы, каждый состоит из четырех идентичных субъединиц. Изозимы имеют молекулярную массу от 200 000 до 250 000 Да; молекулярная масса субъединицы — от 50 000 до 61 000 Да. Фермент характеризуется высокой специфичностью по отношению к фосфоенолпирувату, менее специфичен к нуклеотидному субстрату. Пируваткиназа относится к группе аллостерических ферментов. Изозимы пируваткиназы отличаются своими регуляторными свойствами. Ферментативная реакция, катализируемая высокоочищенной пируваткиназой из скелетных

мышц, описывается кинетикой Михаэлиса—Ментен. Аллостерические свойства фермента выявляются в присутствии аминокислот-ингибиторов. Так, кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии *L*-фенилаланина (5—10 мМ) имеет *S*-образную форму. Аллостерическое поведение фермента наблюдается при pH выше 7,0 (7,5—7,6), а также в присутствии низкой концентрации субстрата — фосфоенолпирувата (0,2—0,3 мМ). Степень ингибирования пируваткиназы *L*-фенилаланином уменьшается при добавлении в реакцию смесь *L*-аланина. Действие аллостерических ингибиторов приводит к уменьшению сродства фермента к субстрату (фосфоенолпирувату). Пируваткиназа скелетных мышц ингибируется АТФ, ацетил-КоА, высокомолекулярными жирными кислотами. Активаторами фермента являются ионы K^+ , Mg^{2+} , ионы Na^+ оказывают ингибирующее влияние.

Величины кажущихся констант Михаэлиса колеблются в зависимости от используемого буфера, pH, температуры и других условий. В трис-НСl буфере, pH 7,4, K_m для АДФ — 0,25 мМ, для фосфоенолпирувата — 0,048 мМ.

Определение активности пируваткиназы

Активность пируваткиназы определяют по образованию пирувата, количество которого измеряют в системе, содержащей лактатдегидрогеназу и НАДН:



Реактивы:

1. Трис-НСl — 60 мМ раствор, pH 7,4.
2. KCl — 3 М раствор.
3. $MgCl_2$ — 0,3 М раствор.
4. АДФ — 60 мМ раствор.
5. Фосфоенолпируват — 24 мМ (трициклогексиламмониевая соль, или К-соль). Ag—Ва-соль фосфоенолпирувата переводят с помощью катионообменника типа Дауэкс-50 в К-соль (с. 43).
6. НАДН — 5 мМ раствор, pH 7,5.
7. Лактатдегидрогеназа.
8. Пируваткиназа. Раствор фермента разводят трис-НСl буфером непосредственно перед определением активности.

Растворы готовят на бидистиллированной воде. Растворы ферментов, НАДН и фосфоенолпирувата до внесения в реакцию смесь хранят на льду.

В спектрофотометрическую кювету (объем 3 мл) вносят следующие компоненты реакции (даны конечные концентрации): 50 мМ трис-НСl буфер, pH 7,4; 100 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$; 2 мМ АДФ; 0,8 мМ фосфоенолпируват; 0,16 мМ НАДН; 5 ед/мл лактатдегидрогеназы. Смесь преинкубируют 2—3 мин, после чего реакцию начинают добавлением пируваткиназы. Регистрируют уменьшение оптической плотности при 340 нм.

Определение белка проводят микробиуретовым методом (с. 81). Концентрацию очищенной пируваткиназы можно измерять спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент $A_{1\%}^{1\text{см}}=5,5$.

Выделение и очистка пируваткиназы из скелетных мышц кролика

Метод I

Реактивы:

1. ЭДТА — 2 мМ раствор, pH 7,0 (раствор для экстракции).
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — сухой, перекристаллизованный из 5 мМ раствора ЭДТА, pH 8,3.
3. Ацетатный буфер — 0,5 М раствор, pH 4,7 (для приготовления буфера используют уксусную кислоту и КОН).
4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,2 М раствор.
5. NH_4OH — 1 н. раствор.

Работу проводят в холодной комнате.

Экстракция. Измельченную мышечную массу (с. 221) взвешивают и гомогенизируют 1 мин в двойном объеме раствора ЭДТА. Перемешивание гомогената продолжают в течение 30 мин. Центрифугируют 20 мин при 13 000 g. Ткань повторно гомогенизируют в одном объеме того же раствора. После центрифугирования супернатанты объединяют и фильтруют через стеклянную вату.

Фракционирование сульфатом аммония. К объединенному супернатанту медленно, при постоянном перемешивании, добавляют сухой сульфат аммония (260 г на 1 л) до концентрации 1,75 М. Перемешивание продолжают в течение 30 мин. Затем суспензию центрифугируют 20 мин при 10 000 g. Осадок отбрасывают. В супернатанте увеличивают концентрацию сульфата аммония до 2,4 М (105 г/л). Перемешивание продолжают еще 30 мин, после чего центрифугируют. Осадок отбрасывают. Концентрацию сульфата аммония проверяют, используя реактив Несслера (с. 87). В супернатанте доводят концентрацию сульфата аммония до 2,6 М (39 г/л). Перемешивают в течение часа, центрифугируют 20 мин при 15 000 g. Супернатант отбрасывают. Осадок растворяют в минимальном объеме 0,2 М ацетатного буфера, pH 4,7.

Кристаллизация. Раствор белка доводят 1 н. раствором аммиака до pH 5,4 и медленно насыщают сухим сульфатом аммония (21 г/л). После этого проверяют pH и с помощью ацетатного буфера (pH 4,7) доводят раствор белка до pH 5,15. Суспензию оставляют при 0—4° С для кристаллизации. Кристаллы собирают центрифугированием (20 мин 15 000 g) и суспендируют в 3,2 М растворе сульфата аммония.

Метод II

Реактивы:

1. ЭДТА — 1 мМ раствор, pH 7,0 (раствор для экстракции).
2. Имидазол — 1 М раствор, pH 7,0.
3. CH_3COOH — 1 М раствор.
4. NH_4OH — 1 М раствор.
5. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — сухой, перекристаллизованный из раствора ЭДТА — 5 мМ, pH 8,3, мелкоизмельченный.
6. Меркаптоэтанол.

7. КМ-целлюлоза.
8. К-фосфатный буфер — 30 мМ раствор, рН 6,0.
9. KCl — 0,3 М раствор, приготовленный на К-фосфатном буфере, рН 6,0.
10. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 80%-ный раствор.

Экстракция. Мышечную массу (с. 221) взвешивают и гомогенизируют 30 с в двойном объеме 1 мМ раствора ЭДТА, рН 7,0. Перемешивание гомогената продолжают в течение часа с помощью механической мешалки. После этого центрифугируют 20 мин при 8000 g. Супернатант фильтруют через стеклянную вату. Осадок отбрасывают.

Тепловая обработка. К отфильтрованному супернатанту добавляют 1 М имидазол до конечной концентрации 20 мМ. Проверяют рН белкового раствора и, если нужно, доводят его значение до 7,0 CH_3COOH или аммиаком. На водяной бане (80°C) нагревают белковый раствор до 60°C, инкубируют 5 мин при постоянном перемешивании. После этого раствор быстро помещают в лед и охлаждают до 10°C. Выпавший осадок отделяют центрифугированием (20 мин, 10 000 g).

Фракционирование сульфатом аммония. К полученному супернатанту медленно, при постоянном перемешивании, добавляют хорошо измельченный сульфат аммония до 54%-ного насыщения (320 г/л). При насыщении сульфатом аммония белковый раствор тщательно охлаждают в сосуде с тающим льдом. Перемешивание продолжают в течение 30 мин, затем центрифугируют 20 мин при 10 000 g. Осадок отбрасывают. К супернатанту добавляют сульфат аммония до 67,5%-ного насыщения (83,5 г/л). Перемешивание продолжают 30 мин и вновь центрифугируют. Супернатант отбрасывают, осадок суспендируют в 80%-ном растворе сульфата аммония, содержащем 10 мМ 2-меркаптоэтанол. Концентрация белка в суспензии составляет 20—40 мг/мл. На этой стадии фермент может храниться при 4°C несколько дней без потери активности.

Ионообменная хроматография. Колонку (40×2,5 см), заполненную КМ-целлюлозой (с. 109), уравнивают 30 мМ К-фосфатным буфером, рН 6,0, содержащим 10 мМ 2-меркаптоэтанол. Перед нанесением на колонку раствор белка диализуют против уравнивающего буфера до полного удаления сульфата аммония. На колонку можно нанести до 500 мг белка. После нанесения белка колонку промывают уравнивающим буфером (примерно 75 мл). Для элюции фермента используют линейный градиент концентрации KCl от 0 до 0,3 М в том же буфере. Общий объем растворов — 1 л. Скорость элюции — 20 мл/ч. Фракции белка с ферментативной активностью объединяют и диализуют против 80%-ного раствора сульфата аммония, содержащего 10 мМ 2-меркаптоэтанол. Фермент хранится несколько месяцев при 0—4°C.

Если в препарате пируваткиназы имеется примесь аденилаткиназы и лактатдегидрогеназы, то ее можно удалить с помощью гельфильтрации на колонке (50×2,5 см) с сефадексом G=200. На колонку наносят 10—20 мг белка и элюируют со скоростью 10—15 мл/ч 50 мМ К-фосфатным буфером, содержащим 10 мМ 2-меркаптоэтанол, рН 7,0.

ЛИТЕРАТУРА

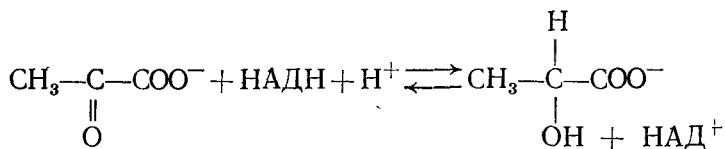
1. Gardenas J., Dyson R., Strandholm J. Bovine Pyruvate Kinases. Purification and characterization of the skeletal muscle isozyme//J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248, N 20. P. 6931.

2. Haggins K., Black J., Kittenberg M. Purification and spargactenization of human muscle pyruvate kinase//Can. J. Biochem. 1977. Vol. 55. P. 301.
3. Каупе F. J. Pyruvate Kinase//The Enzymes. N. Y., 1973. Vol. 8. P. 353.
4. Kwan C.-J., Davis R. pH-Dependent amino acid induced conformational changes of rabbit muscle pyruvate kinase//Can. J. Biochem. 1980. Vol. 58. P. 188.

15. ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

(L-лактат: НАД⁺-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27)

Лактатдегидрогеназа катализирует реакцию восстановления пирувиноградной кислоты в молочную:



Лактатдегидрогеназа — тетрамер (молекулярная масса 135 000—140 000 Да), построенный из мономеров двух типов. Известны пять изоферментов лактатдегидрогеназы: ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄ и ЛДГ₅ (с. 336), отличающихся по физико-химическим и кинетическим свойствам. Лактатдегидрогеназа содержит реакционноспособные SH-группы, модификация которых приводит к потере активности. Фермент ингибируется малонатом, оксалатом, оксаматом, избытком пирувата, избытком НАД⁺. Константы Михаэлиса лактатдегидрогеназы мышц: для пирувата — 0,16 мМ, для НАДН — 0,025 мМ.

Определение активности лактатдегидрогеназы

Активность лактатдегидрогеназы измеряют спектрофотометрически при 340 нм по нарастанию (в реакции окисления лактата — А) или убыли (в реакции восстановления пирувата — Б) пирувата.

Реактивы:

1. Глициновый буфер — 0,1 М раствор, рН 9,0, содержащий 50 мМ гидразин.
2. Калий-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,0.
3. Лактат — 0,2 М раствор.
4. Пируват — 0,16 М раствор.
5. НАД⁺ — 7,5 мМ раствор.
6. НАДН — 12 мМ раствор.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

А. В спектрофотометрическую кювету помещают реакционную смесь, содержащую в объеме 3 мл 0,1 М глициновый буфер, рН 9,0, содержащий 50 мМ гидразин (2,5 мл), а также лактат (конечная концентрация — 6,7 мМ) и НАД⁺ (конечная концентрация — 0,25 мМ). Реакцию начинают добавлением 20—30 мкл раствора лактатдегидрогеназы. Измеряют нарастание поглощения при 340 нм.

Б. В спектрофотометрическую кювету помещают реакционную смесь, содержащую в объеме 3 мл 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,0 (2,5 мл), а также пируват (конечная концентрация — 1,6 мМ) и НАДН (конечная концентрация — 0,2 мМ). Реакцию начинают добав-

лением 20—30 мкл раствора лактатдегидрогеназы. Измеряют убыль поглощения при 340 нм.

Определение белка проводят спектрофотометрически, учитывая, что при 280 нм $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 14,5$.

Выделение и очистка фермента из скелетных мышц кролика

Метод I

Реактивы:

1. КОН — 0,03 н. раствор, приготовленный на 1 мМ ЭДТА.
2. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
3. Сульфат аммония — насыщенный раствор, доведенный аммиаком до pH 7,5.
4. Дитиотреитол (ДТТ).

Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Всю работу проводят при 2—4° С.

Экстракция. К 150—200 г охлажденной мышечной массы (получение см. на с. 221) добавляют равный (по отношению к весу ткани) объем 0,03 н. раствора КОН, содержащего 1 мМ ЭДТА и 0,2 мМ ДТТ, экстрагируют в течение 10 мин, после чего центрифугируют (20 мин, 10 000 g). Осадок повторно экстрагируют половинным объемом щелочи в течение 5 мин и вновь центрифугируют; pH экстракта колеблется от 6,6 до 7,3.

Фракционирование сульфатом аммония. К экстракту добавляют небольшими порциями при помешивании раствор сульфата аммония до насыщения 0,52 (104 мл на 100 мл экстракта). Через 30—40 мин после добавления последней порции раствора соли смесь центрифугируют (можно слить на воронку и оставить на ночь для фильтрования). Осадок отбрасывают, к раствору добавляют сухой, хорошо измельченный сульфат аммония до насыщения 0,72 (13 г на 100 мл). Через 30—40 мин после добавления последней порции соли смесь центрифугируют (3000 g, 30 мин). Осадок растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, чтобы концентрация белка была равна 20—25 мг/мл. К этому раствору добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до достижения насыщения 0,55 (122 мл на 100 мл). После стояния в течение 30 мин центрифугируют (3000 g, 30 мин). Осадок растворяют в небольшом объеме воды.

Тепловая обработка и кристаллизация. Раствор белка ставят на 3 мин на водяную баню, нагревую до 58° С, после чего тотчас же переносят в сосуд со льдом. Осадок, выпавший после тепловой обработки, удаляют центрифугированием (10 000 g, 20 мин). К центрифугату медленно добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до помутнения. Для кристаллизации раствор оставляют на ночь на холоде.

Перекристаллизация. Суспензию центрифугируют (20 мин при 12 000 g). Кристаллический осадок растворяют в 1 мМ ЭДТА, содержащем 0,2 мМ ДТТ. Нерастворившийся осадок отбрасывают, к раствору добавляют сульфат аммония до насыщения 0,55. Это вызывает кристаллизацию фермента. Через несколько дней кристаллы отделяют центрифугированием, взбалтывают в небольшом объеме полунасыщенного раствора сульфата аммония и хранят в виде суспензии на холоде.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 30 мМ раствор, рН 7,2, содержащий 5 мМ ЭДТА.
2. Сульфат аммония, перекристаллизованный в присутствии ЭДТА (1,5 г/л).
3. ЭДТА — 0,2 мМ раствор, доведенный имидазолом до рН 7,2.
4. Имидазол — 10 мМ раствор, приготовленный на 0,2 мМ ЭДТА и доведенный соляной кислотой до рН 7,2 (буфер А).
5. Трис — 50 мМ раствор, приготовленный на 0,2 мМ ЭДТА и доведенный соляной кислотой до рН 8,0 (буфер Б).
6. Трис — 50 мМ раствор, приготовленный на 0,2 мМ НАДН и доведенный соляной кислотой до рН 8,0 (буфер В).
7. Трис — 10 мМ раствор, приготовленный на 0,2 мМ растворе НАДН и 10 мМ NaCl и доведенный до рН 8,0 (буфер Г).
8. Трис — 10 мМ раствор, приготовленный на 0,2 мМ растворе НАДН и 0,1 М NaCl и доведенный до рН 8,0 (буфер Д).
9. Трис — 10 мМ раствор, приготовленный на 0,2 мМ растворе НАДН и 0,3 М NaCl и доведенный соляной кислотой до рН 8,0 (буфер Е).

В реактивы 3—9 непосредственно перед началом работы добавляют дитиотреитол до конечной концентрации 0,2 мМ.

10. HCl — 0,5 н. раствор.
11. NaOH — 0,5 н. раствор.
12. Na₂HPO₄ — 1 н. раствор.
13. Сефадекс G-50.
14. КМ-целлюлоза.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Всю работу проводят при 2—4° С.

Экстракция. Мышечную массу (приготовление см. на с. 221) заливают холодным раствором экстракции: 30 мМ фосфат калия, 5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотреитол, рН 7,2 (соотношение веса мышц к объему раствора экстракции 1:3). Мышцы гомогенизируют в течение 2—2,5 мин. Гомогенат перемешивают с помощью механической мешалки в течение 10—15 мин и центрифугируют (10 000 g, 30 мин). Полученный гомогенат пропускают через 6 слоев марли для удаления частиц жира. Измеряют объем экстракта.

Фракционирование сульфатом аммония. К экстракту медленно при перемешивании механической мешалкой добавляют сухой сульфат аммония (27,7 г на 100 мл). После добавления последней порции соли замутившийся экстракт перемешивают еще в течение 30 мин, а затем центрифугируют (20 000 g, 1 ч). Осадок отбрасывают, а супернатант пропускают через 6 слоев марли и определяют его объем. К полученному раствору вновь добавляют мелкоизмельченный сульфат аммония (10 г на 100 мл); после добавления последней порции соли раствор продолжают перемешивать еще в течение 30 мин, а затем центрифугируют (20 000 g, 1 ч). Супернатант отбрасывают. Осадок, содержащий лактатдегидрогеназу, можно оставить на ночь.

Обессоливание. Все дальнейшие процедуры желательно провести в течение одного дня. Осадок растворяют в минимальном объеме (около 3 мл) буфера следующего состава: 0,2 мМ ЭДТА, 0,2 мМ дитиотреитол (доведено имидазолом до рН 7,2) и наносят на колонку

(2×8 см) с сефадексом G-50, уравновешенную тем же буфером. Собирают фракции, содержащие лактатдегидрогеназу, и проверяют полноту удаления ионов сульфата (проба с BaCl₂). Пробы, дающие даже минимальное помутнение, отбрасывают. Фракции, свободные от ионов сульфата, объединяют и определяют объем полученного раствора и концентрацию белка.

Хроматография на КМ-целлюлозе. Аффинная элюция. Измеряют рН раствора и доводят его соляной кислотой до 7,2. Раствор белка наносят на колонку с КМ-целлюлозой (13×5,5 см), уравновешенную буфером А, рН 7,2. После того как белок адсорбировался на колонке, ее промывают 75—100 мл буфера А (скорость тока ~200 мл/ч). На этой стадии может потребоваться использование перистальтического насоса. Затем колонку промывают буфером Б, рН 8,0. При этом элюируются различные примесные белки, а лактатдегидрогеназа остается связанной с носителем. После того как через колонку пройдет 5—6 объемов буфера Б, оптическая плотность элюата при 280 нм начинает уменьшаться. Необходимо продолжать промывание буфером Б до тех пор, пока снижение A_{280} не прекратится (A_{280} может достигнуть значения 0,1—0,2 или меньше). Затем на колонку подают буфер В. После прохождения через колонку 1—2 объемов этого буфера определяют активность лактатдегидрогеназы в собираемых фракциях. В случае ее отсутствия на колонку подают буфер Г. Определяют активность лактатдегидрогеназы во фракциях элюата. Если ее нет либо она незначительна, на колонку подают буфер Д. Собирают фракции, определяют в них активность фермента и содержание белка (по поглощению при 280 нм за вычетом фона, который дает НАДН). Фракции, содержащие наибольшую активность, объединяют и добавляют к ним ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ и мелкоизмельченный сульфат аммония для кристаллизации.

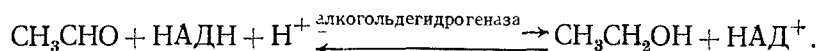
ЛИТЕРАТУРА

1. Уилкинсон Дж. Изоферменты М., 1968.
2. Schwert G., Winer A. Lactate dehydrogenase//The Enzymes. N. Y.; L., 1963. Vol. 7. P. 127.
3. Everse A., Kaplan N. O. Lactate dehydrogenase//Adv. in Enzymology and Related Areas of Molec. Biol. San Francisco. 1973. Vol. 11. P. 61.
4. Adams M. J., Buehner M., Chandrasekhar K. et al. Structure-function relationships in lactate dehydrogenase//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. Vol. 70. P. 1968.
5. Ashmarina L. I., Muronetz V. I., Nagradova N. K. Lactate dehydrogenase can function in a monomeric form. The principles of an active subunit preparation//Biochem. Int. 1981. Vol. 3. P. 415.

16. АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА

(Алкоголь: НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1)

Алкогольдегидрогеназа катализирует конечную реакцию брожения — восстановление (обратимое) уксусного альдегида в этиловый спирт:



Фермент относится к классу оксидоредуктаз. Обнаружен во многих тканях животных и растений, а также у микроорганизмов.

Алкогольдегидрогеназа пекарских дрожжей энергично окисляет первичные спирты с неразветвленной цепью и со значительно меньшей скоростью спирты с разветвленной цепью, вторичные спирты, некоторые оксикислоты, аминоспирты и полиспирты. Молекула фермента (молекулярная масса около 150 000) состоит из четырех субъединиц, имеет четыре активных центра, содержит четыре атома прочно связанного цинка. Алкогольдегидрогеназа является сульфгидрильным ферментом. В трис- и пирогосфатном буферах оптимум рН равен 8,6. K_m для НАД и НАДН равны соответственно $1,7 \times 10^{-4}$ М и $2,3 \times 10^{-5}$ М, для этилового спирта — $1,6 \times 10^{-2}$ М, для уксусного альдегида — 3×10^{-4} М. $A_{1\%}^{1\text{см}}$ при 280 нм равна 12,6.

Определение активности алкогольдегидрогеназы

Окисление этилового спирта под действием алкогольдегидрогеназы сопровождается восстановлением НАД (моль на моль), что регистрируют спектрофотометрически по увеличению оптической плотности при 340 нм (с. 7).

Реактивы:

1. Натрий-пирогосфатный буфер — 60 мМ раствор, рН 8,5.
2. Этанол — 3 М раствор.
3. НАД — 15 мМ раствор, рН 6,0. Может несколько дней храниться на холоде.
4. Калий-фосфатный буфер — 10 мМ раствор, рН 7,5.
5. Бычий сывороточный альбумин, 0,1%-ный раствор, приготовленный на 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5.
6. Алкогольдегидрогеназа — 1 Е/мл, свежеприготовленный раствор на 0,1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5.

В спектрофотометрическую кювету помещают реакционную смесь, содержащую (указаны конечные концентрации) 6 мМ буфер, 100 мМ этанол и 0,5 мМ НАД. Реакцию начинают добавлением 0,05 мл раствора алкогольдегидрогеназы. Общий объем пробы — 3 мл. Перемешивают и измеряют увеличение оптической плотности при 340 нм в течение 45 с. Состав контрольной кюветы тот же, только отсутствует субстрат.

Выделение алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей

Реактивы:

1. Двухзамещенный фосфат натрия — 66 мМ раствор.
2. Ацетон, х. ч.
3. Ацетон технический.
4. Калий-фосфатный буфер — 1 мМ раствор, рН 7,5.
5. Сухой лед.
6. Сульфат аммония, порошок.
7. Сульфат аммония, насыщенный раствор.
8. Сульфат аммония, насыщение 0,5.

Работу, если это специально не оговаривается, проводят в холодной комнате.

Подготовка исходного материала. Измельченные свежие пекарские дрожжи сушат на воздухе, помещая их на натянутую металлическую сетку, покрытую фильтровальной бумагой. Периодически бумагу меняют, дрожжи измельчают руками. Высушенные дрожжи хранят на холоде в герметической упаковке.

Экстракция. Стакан с 200 г сухих дрожжей и 600 мл двузамещенного фосфата натрия помещают на два часа в водяной термостат при 37° С, перемешивая до получения однородной суспензии, затем оставляют на 3 ч при комнатной температуре, после чего центрифугируют 30 мин при 18 000 g.

Тепловая обработка. Центрифугат разливают в тонкие стеклянные пробирки, погружают в водяной термостат при 55° С на 16—18 мин (в зависимости от диаметра и толщины стенок пробирок), охлаждают в водяной бане со льдом, центрифугируют 7 мин при 40 000 g и осадок отбрасывают. Центрифугат может ночь храниться в холодильнике.

Фракционирование ацетоном. Стакан с центрифугатом помещают в ацетоновую баню с температурой около —6° С, добавляют предварительно охлажденный до —5° С ацетон из расчета 50 мл на каждые 100 мл дрожжевого экстракта, поддерживая температуру смеси в стакане не выше —2° С. Центрифугируют при —2° С 5 мин при 18 000 g и к центрифугату, как и в первый раз, добавляют ацетон в количестве 55 мл на каждые 100 мл дрожжевого экстракта. Центрифугируют 5 мин при —2° С и 40 000 g; осадок суспендируют в 40 мл холодной воды и диализуют в течение 3 ч против одного литра фосфатного буфера, перемешивая и 3—4 раза меняя буфер.

Кристаллизация. Ферментный раствор центрифугируют 5 мин при 40 000 g, осадок отбрасывают; к центрифугату медленно, при перемешивании, добавляют сульфат аммония из расчета 3,6 г на каждые 10 мл. Через 20 мин после окончания добавления центрифугируют 15 мин при 40 000 g, осадок растворяют в 15—20 мл холодной воды, добавляют сульфат аммония в количестве 2 г на каждые 10 мл и центрифугируют 10 мин при 40 000 g. Осадок отбрасывают, к центрифугату медленно, при осторожном перемешивании, в течение нескольких часов добавляют сульфат аммония до насыщения 0,6.

Перекристаллизация. Суспензию кристаллов центрифугируют 15 мин при 40 000 g, осадок растворяют в минимальном объеме холодной воды и медленно, при перемешивании, добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до насыщения 0,4—0,5. Через 30—40 мин после окончания добавления центрифугируют 15 мин при 40 000 g, осадок суспендируют в минимальном объеме раствора сульфата аммония насыщением 0,5 и хранят в холодильнике.

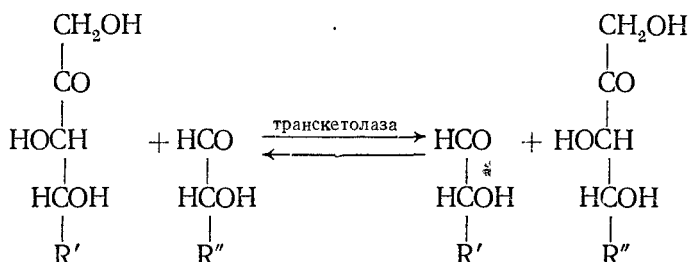
ЛИТЕРАТУРА

1. Sytkowski A. I. Metal Stoichiometry, Coenzyme Binding, and Zinc and Cobalt Exchange in Highly Purified Yeast Alcohol Dehydrogenase//Arch. Biochem. Biophys. 1977. Vol. 184. P. 505.
2. Sund H., Theorell H. Alcohol Dehydrogenases//The Enzymes. N. Y., 1963. Vol. 7. P. 25.
3. Bränden C. I., Jörnvall H., Eklund H. et al. Alcohol Dehydrogenases//The Enzymes. N. Y., 1975. Vol. 11. P. 104.

17. ТРАНСКЕТОЛАЗА

(*D*-седогептулозо-7-фосфат: *D*-глицеральдегид-3-фосфат-глицольальдегидтрансфераза, КФ 2.2.1.1)

Транскетолаза — фермент пентозного пути превращения углеводов — катализирует обратимый перенос двууглеродного остатка с кетосахаров на альдосахара:



Субстратами-донорами двууглеродного остатка являются: ксилулозо-5-фосфат, фруктозо-6-фосфат, седогептулозо-7-фосфат и др. Функцию субстратов-акцепторов выполняют: *D*-рибозо-5-фосфат, *D*-глицеральдегид-3-фосфат, *D*-эритрозо-4-фосфат и др.

Транскетолаза является тиаминовым ферментом. Относится к классу трансфераз. Обнаружена во всех исследованных органах и тканях животных, а также в растениях и у микроорганизмов.

ТРАНСКЕТОЛАЗА ИЗ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

Молекулярная масса фермента — 159 000 Да. Молекула состоит из двух субъединиц; диссоциация на субъединицы происходит при понижении концентрации белка в растворе.

Молекула транскетолазы имеет два активных центра, характеризующихся различным сродством к тиаминпирофосфату. Соответствующие величины K_m (в присутствии кальция) равны приблизительно $3,2 \cdot 10^{-8}$ и $2,5 \cdot 10^{-7}$ М.

В процессе выделения фермента из дрожжей происходит частичное отщепление от него тиаминпирофосфата. Полное отделение можно получить, выдерживая фермент в щелочной среде (рН 8,0) или путем диализа против раствора ЭДТА. Взаимодействие кофермента с апоферментом осуществляется при участии ионов двухвалентных металлов, таких как Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и др. В нативной холотранскетолазе обнаружен только кальций в количестве 2 г·атом на моль белка.

Оптимум рН действия фермента — 7,6. Величины K_m для рибозо-5-фосфата и ксилулозо-5-фосфата равны соответственно $4 \cdot 10^{-4}$ и $2,1 \cdot 10^{-4}$ М. Оптическая плотность для раствора транскетолазы, содержащего в 1 мл 1 мг белка, при 280 нм равна 1,45.

Кристаллический фермент при хранении его в растворе сульфата аммония 50%-ного насыщения стабилен на холоде в течение нескольких месяцев.

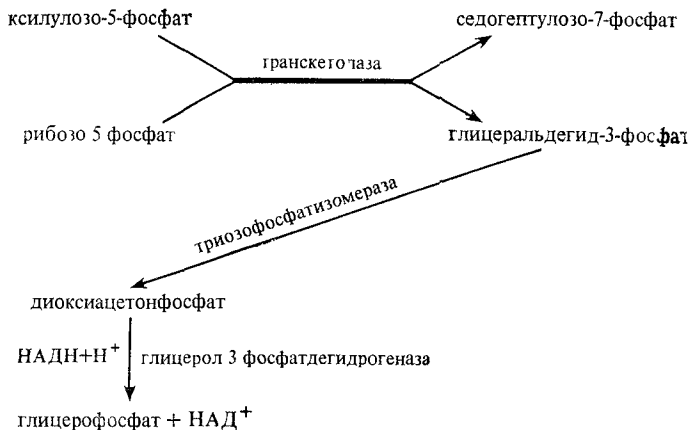
Определение активности транскетолазы

А. По убыли восстановленной формы НАД

Используя вспомогательные ферменты — триозофосфатизомеразу и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу, за ходом транскетолазной реакции

можно следить спектрофотометрически по убыли восстановленного НАД.

Последовательность реакций такова:



Таким образом, количество молей восстановленной формы НАД, вступившей в реакцию, равно количеству молей глицеральдегид-3-фосфата, образовавшегося под действием транскетолазы. Убыль восстановленного НАД определяют спектрофотометрически по уменьшению величины оптической плотности при 340 нм (с. 7).

Реактивы:

1. Глицил-глициновый буфер (рН 7,6) — 0,5 М и 0,05 М растворы.
2. Восстановленный НАД — 2 мМ раствор, рН 8,0. На холоде может храниться несколько дней.
3. Фосфопентозы — раствор, 25 мг/мл (в пересчете на бариевую соль). Используется в качестве субстрата транскетолазной реакции. Смесь фосфопентоз получают в виде бариевой соли (с. 287). Перед использованием ее переводят в калиевую соль и рН раствора доводят до 6,5. В таком виде раствор можно хранить несколько дней при -16°C .
4. Тиаминпирофосфат — 3 мМ. В холодильнике может храниться несколько дней.
5. Хлористый магний — 0,06 М.
6. Сульфатно-аммонийная фракция, содержащая триозофосфатизомеразу и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (получение см на с. 290). Для использования ее растворяют в бидистиллированной воде до получения концентрации белка, равной 50—100 мг/мл. Может несколько дней храниться при -16°C .
7. Транскетолaza — препарат фермента разводят 0,05 М глицил-глициновым буфером (рН 7,6) таким образом, чтобы при добавлении в реакционную смесь 0,1 мл полученного раствора изменение оптической плотности при 340 нм составляло бы около 0,04 в 1 мин.

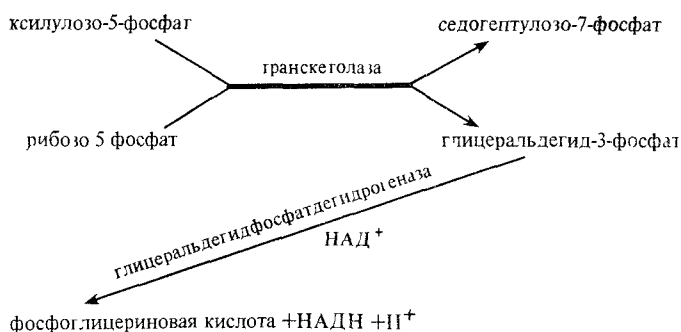
В спектрофотометрическую кювету помещают реакционную смесь следующего состава (указаны конечные концентрации): 25 мМ гли-

цил-глициновый буфер, 0,1 мМ НАД восстановленный, вспомогательные ферменты (1,5—3 мг белка на пробу), фосфопентозы (5 мг на пробу), 0,1 мМ тиаминпирофосфат, 3мМ хлористый магний. Реакцию начинают добавлением разведенного соответствующим образом раствора транскетолазы. Общий объем пробы — 3 мл. Контрольная кювета не содержит исследуемого фермента

Изменение оптической плотности измеряют в течение 5 мин с одномоментными интервалами.

Б По скорости восстановления НАД

В данном случае в качестве вспомогательного фермента используется глицеральдегидфосфатдегидрогеназа и транскетолазную активность измеряют по количеству восстановленного НАД, образующегося при окислении одного из продуктов транскетолазной реакции — фосфоглицеринового альдегида:



За ходом процесса следят спектрофотометрически по увеличению оптической плотности при 340 нм (см с 7) На 1 моль вступившего в реакцию субстрата образуется 1 моль восстановленного НАД.

Реактивы:

1. Глицил-глициновый буфер (рН 7,6) — 0,5 и 0,05 М растворы.
2. НАД — 6 мМ раствор, рН 6,0 В холодильнике может храниться несколько дней.
3. Хлористый магний — 0,06 М раствор
4. Арсенат натрия — 0,5 М раствор.
5. Тиаминпирофосфат — 3 мМ раствор В холодильнике может храниться несколько дней.
6. Цистеин — 0,01 М раствор, рН 7,6 (свежеприготовленный)
7. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа — 76 Е/мл Фермент не должен содержать триозофосфатизомеразу, выделяется из мышц кролика (с. 253).
8. Раствор фосфопентоз (с. 280).
9. Транскетолаза (с. 280).

В спектрофотометрическую кювету помещают реакцию смесь следующего состава (указаны конечные концентрации): 25 мМ глицил-глициновый буфер (рН 7,6), 0,3 мМ НАД, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа — 5 Е на пробу, 3 мМ хлористый магний, 5 мМ арсе-

тиаминпирофосфат, 5 мл цистеин, фосфопентозы — 5 мг на пробу. Реакцию начинают добавлением соответствующим образом разведенного раствора транскетолазы. Общий объем пробы — 3 мл. Контрольная кювета не содержит исследуемого фермента.

Изменение оптической плотности измеряют в течение 5 мин с одномоментными интервалами.

В. По количеству образующегося седогептулозо-7-фосфата

Одним из продуктов транскетолазной реакции является седогептулозо-7-фосфат (при использовании в качестве субстратов ксилулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата). Определяя его количество, можно судить о каталитической активности фермента. Седогептулозо-7-фосфат определяют по цветной реакции с цистеином в присутствии серной кислоты.

Реактивы:

1. Глицил-глициновый буфер — 0,5 и 0,05 М растворы, pH 7,6.
2. Хлористый магний — 0,06 М раствор.
3. Тиаминпирофосфат — 2,8 мМ раствор. В холодильнике может храниться несколько дней.
4. Фосфопентозы — раствор, 50 мг/мл (в пересчете на бариевую соль). Приготовление см. на с. 280.
5. Транскетолаза — около 0,6 Е/мл. Исходный препарат фермента разводят до требуемой концентрации 0,05 М глицил-глициновым буфером (pH 7,6).
6. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор.
7. Реактивы для определения седогептулозо-7-фосфата:
 - а) серная кислота — раствор, содержащий шесть объемов концентрированной кислоты и один объем дистиллированной воды;
 - б) солянокислый цистеин — свежеприготовленный 3%-ный раствор;
 - в) ангидрид седогептулозы — стандартный раствор, 0,4 мМ.

В химические пробирки, стоящие во льду, помещают смесь: 0,35 М глицил-глициновый буфер, 4 мМ хлористый магний, 0,2 мМ тиаминпирофосфат (указаны конечные концентрации), 0,06 Е транскетолазы. Общий объем смеси — 0,7 мл. Содержимое пробирок перемешивают и через 5—10 мин добавляют по 0,1 мл раствора фосфопентоз. Повторно перемешивают, отбирают по 0,1 мл и выливают в пробирки, содержащие по 0,4 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (пробы до инкубации).

Пробирки с реакционной смесью вынимают из льда и помещают в водяной термостат при 37° С. Через 5, 10, 15 и 20 мин отбирают из инкубационной смеси по 0,1 мл и переносят в пробирки, содержащие по 0,4 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты.

Пробы помещают в воду с толченым льдом (в качестве контроля ставят пробы, содержащие вместо исследуемого раствора 0,5 мл дистиллированной воды) и добавляют к ним по 2,5 мл раствора серной кислоты. Тщательно перемешивают и переносят в кипящую водяную баню на 3 мин (следят за тем, чтобы вода при этом не переставала кипеть). Затем штатив с пробирками переносят в толченый лед и в

каждую добавляют по 0,05 мл раствора солянокислого цистеина. Тщательно перемешивают и оставляют на 18 ч при комнатной температуре или помещают на 2 ч в водяной термостат при 60° С. Развившаяся окраска стабильна в течение нескольких часов. Пробы фотометрируют (опытные пробы против контрольных) при 510 и 540 нм.

Для построения калибровочной кривой стандартный раствор ангидрида седогептулозы наливают в пробирки по 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5 мл соответственно. Объем доводят водой до 0,5 мл и затем обрабатывают, как указано выше.

При расчете берут разницу величин оптической плотности при 510 и 540 нм.

Выделение фермента из дрожжей

Реактивы:

1. Двухзамещенный фосфат натрия — 66 мМ раствор.
2. Калий-фосфатный буфер — 5 мМ раствор, рН 7,7.
3. КОН — 3 н. и 1 н. растворы
4. Ацетон, х. ч.
5. Ацетон технический
6. Этиловый спирт.
7. Сухой лед.
8. Сульфат аммония, сухой.
9. Сульфат аммония, насыщенный раствор, доведенный аммиаком до рН 7,6.
10. ДЭАЭ-целлюлоза, уравновешенная 5 мМ калий-фосфатным буфером, рН 7,7 (с. 109).

Подготовка исходного материала. Свежие пекарские дрожжи сушат в токе теплого воздуха. В герметически закрытой посуде высушенные дрожжи могут храниться в холодильнике около года. Выделение фермента, где это специально не оговаривается, проводят в холодной комнате.

Экстракция. 300 г сухих дрожжей заливают 900 мл 66 мМ раствора двухзамещенного фосфата натрия и помещают при периодическом перемешивании в водяной термостат при 40° С на 2,5 ч. Центрифугируют 20 мин при 18 000 g и осадок отбрасывают.

Фракционирование ацетоном. Стакан с центрифугатом, полученным на предыдущей стадии, помещают в ацетоновую баню при минус 4 — минус 6° С. Добавляют при перемешивании ацетон в количестве 1/2 объема центрифугата, предварительно охлажденный до 0 — минус 2° С (температура в стакане при приливании ацетона должна быть около —2° С). Затем раствор перемешивают еще 1—2 мин, после чего центрифугируют при —2° С 5 мин (18 000 g) и осадок отбрасывают. К центрифугату при тех же условиях, что и в первый раз, добавляют такое же количество ацетона. Осадок собирают центрифугированием, размешивают с 100 мл холодной бидистиллированной воды и ставят на ночь на диализ против 50 объемов бидистиллированной воды. Центрифугируют 5 мин при 18 000 g и осадок отбрасывают.

Тепловая обработка. Центрифугат предыдущей стадии разливают в длинные тонкостенные химические пробирки и помещают в водяной термостат при 55° С на 15 мин. Затем центрифугируют 10 мин при 18 000 g и осадок отбрасывают

помещают в ацетоновую баню при минус 2 — минус 4°С. Раствор перемешивают до тех пор, пока его температура не снизится до 0°С, после чего при перемешивании начинают добавлять этанол, предварительно охлажденный до —8°С (—10°С). Понижением температуры в ацетоновой бане с помощью сухого льда добиваются того, что температура в стакане постепенно снижается до —6°С

После того как весь этанол добавлен (0,5 объема по отношению к объему ферментного раствора), раствор перемешивают еще 5 мин, после чего центрифугируют при —6°С в течение 10 мин (18 000 g). Центрифугат отбрасывают, осадок размешивают при комнатной температуре в 6—10 мл воды и центрифугируют повторно при 2—4°С в течение 10 мин (40 000 g). Осадок отбрасывают. На этой стадии ферментный раствор может храниться 3—4 дня в холодной комнате или 10—12 дней при —16°С без потери ферментативной активности. Перед использованием для дальнейшей очистки его центрифугируют, как указано выше, и осадок отбрасывают.

Хроматографирование на ДЭАЭ-целлюлозе. Часть центрифугата предыдущей стадии (400—500 мг белка) наносят на колонку ДЭАЭ-целлюлозы (3,0×5,5 см), уравновешенную 5 мМ калий-фосфатным буфером, рН 7,7. Такой же буфер используют и для элюции, собирая фракции по 5 мл со скоростью 1 мл/мин. Определяют в них белок и транскетолазную активность. Фракции с высокой удельной активностью объединяют, остальные отбрасывают.

Фракционирование сульфатом аммония. К ферментному раствору добавляют при перемешивании сульфат аммония из расчета 2,9 г на каждые 10 мл. Добавлением 1 М раствора калиевой щелочи доводят рН до 7,6 и оставляют при перемешивании на 15 мин. Если выпадает осадок, его удаляют центрифугированием при 40 000 g в течение 5 мин. К центрифугату при комнатной температуре добавляют еще сульфат аммония (1,3 г на каждые 10 мл раствора) и через 30 мин центрифугируют 15 мин при 40 000 g. Центрифугат отбрасывают, осадок растворяют в 5 мМ фосфатном буфере (рН 7,7) до получения конечной концентрации белка, равной 2 мг/мл. К полученному раствору добавляют сухой сульфат аммония до насыщения 0,5, и если выпал осадок, центрифугируют 5 мин при 40 000 g. Осадок отбрасывают, к центрифугату добавляют КОН до рН 7,6 и затем насыщенный раствор сульфата аммония (рН 7,6) до насыщения 0,55. Через 15 мин центрифугируют при 40 000 g в течение 10 мин.

Аналогичным образом получают последовательно сульфатно-аммонийные фракции насыщения 0,55—0,59; 0,59—0,64; 0,64—0,70 соответственно. Осадки растворяют в минимальном объеме 5 мМ фосфатного буфера (рН 7,6) и в полученных растворах определяют белок и транскетолазную активность. Основное количество фермента обычно обнаруживается во фракции насыщения 0,59—0,64.

Кристаллизация. При комнатной температуре к раствору сульфатно-аммонийной фракции, содержащей основное количество фермента, добавляют при помешивании насыщенный раствор сульфата аммония (рН 7,6) до слабого помутнения. Через 30—40 мин фермент переносят в холодильник.

В таком виде фермент может храниться длительное время без потери своих каталитических свойств. Для работы используют суспензию транскетолазы (не центрифугируя), так как фермент относительно равномерно распределен между осадком и маточным раствором.

Фермент имеет молекулярный вес порядка 150 000 Да и субъединичную структуру типа $\alpha_2\beta_2$. Молекулярная масса α -субъединиц — около 50 000 Да, β -субъединиц — около 25 000 Да.

Препараты транскетолазы выделяются из печени свиньи в виде холофермента, отделить от него тиаминпирофосфат не удастся.

Оптическая плотность для раствора фермента, содержащего 1 мг/мл, при 280 нм равна 1,24. Оптимум каталитического действия лежит при pH 7,8.

Выделение фермента

Реактивы:

1. Ацетон.
2. Карбонат натрия — 15 мМ раствор.
3. Протаминсульфат.
4. ДЭАЭ-целлюлоза, уравновешенная 2 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,6 (с. 109).
5. ДЭАЭ-сефадекс А-25, уравновешенный 0,02 М трис-HCl буфером, pH 9,2 (с. 109).
6. Сефадекс G-200, уравновешенный 0,05 М трис-HCl буфером, pH 8,5 (с. 109).
7. Трис-HCl буфер — 0,05 М раствор, pH 8,5.
8. KCl — 0,1 М и 0,02 М растворы.
9. Сульфат аммония, сухой.
10. Сульфат аммония — насыщенный раствор, pH 8,5.

Приготовление исходного препарата. Печень свиньи транспортируют в лабораторию во льду. Освобождают от крупных сосудов, заливают 4-кратным объемом предварительно охлажденного до -20°C ацетона и гомогенизируют в течение 2 мин. Быстро фильтруют на холоде с отсасыванием. Фильтрат отбрасывают, осадок повторно обрабатывают ацетоном, как указано выше, и измельчают вручную при комнатной температуре. Полученный порошок хранят в вакуум-эксикаторе в холодильнике.

Экстракция. 15 г препарата в виде ацетонового порошка заливают 150 мл 15 мМ раствора карбоната натрия и оставляют при перемешивании на 45 мин при комнатной температуре. Центрифугируют 10 мин в рефрижераторной центрифуге при 40 000 g. Осадок отбрасывают, pH центрифугата доводят до 8,0. Полученный экстракт может храниться в холодильнике в течение суток без потери активности.

Вся последующая работа проводится в холодной комнате.

Обработка протаминсульфатом. К тканевому экстракту медленно, при помешивании, добавляют протаминсульфат из расчета 1 г на 20 г белка (рассчитанную навеску протаминсульфата предварительно растворяют в минимальном объеме бидистиллированной воды). Перемешивают в течение 10 мин, после чего центрифугируют 15 мин при 40 000 g и осадок отбрасывают.

Обработка ДЭАЭ-целлюлозой. ДЭАЭ-целлюлозу предварительно уравнивают 2 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,6) и отжимают на бухнеровской воронке. Порцию отжатого осадка добавляют к центрифугату, полученному на предыдущей стадии (в соотношении приблизительно 1:5), и перемешивают 10—15 мин. Центрифугируют

5 мин при 40 000 g, осадок отбрасывают, центрифугат еще раз обрабатывают ДЭАЭ-целлюлозой в соотношении 1 : 15. Аналогичную обработку повторяют до тех пор, пока концентрация белка в ферментном растворе не снизится до 6—8 мг/мл. На данной стадии ферментный раствор может храниться в замороженном состоянии в течение нескольких недель без потери транскетолазной активности.

Первое фракционирование сульфатом аммония. К ферментному раствору, полученному на предыдущей стадии, добавляют порошок сульфата аммония до насыщения 0,5. Раствор перемешивают 15 мин, после чего центрифугируют 15 мин при 40 000 g. Осадок отбрасывают, к центрифугату добавляют еще сульфат аммония до насыщения 0,75, перемешивают 15 мин, затем снова центрифугируют при тех же условиях. Центрифугат отбрасывают, осадок растворяют в 15 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,5). В замороженном виде полученный раствор может храниться в течение суток без потери транскетолазной активности.

Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-25. Через колонку с подвижным адаптером с ДЭАЭ-сефадексом А-25 (5×26 см), уравновешенную 0,02 М трис-НСl буфером (рН 9,2), пропускают последовательно (снизу вверх) 1 л 0,02 М раствора хлористого калия и ферментный раствор, полученный на предыдущей стадии. Как только ферментный раствор полностью впитывается, начинают пропускать 0,1 М хлористый калий, который используется в качестве элюирующего раствора. Скорость элюции — 90 мл/ч, объем элюируемых фракций — 3 мл. Во фракциях определяют белок и транскетолазную активность. Фракции с удельной активностью 0,1 Е/мг и выше объединяют и используют для дальнейшей работы (можно хранить в холодильнике в течение ночи).

Второе фракционирование сульфатом аммония. К ферментному раствору, полученному на предыдущей стадии, добавляют насыщенный раствор сульфата аммония (рН 8,5) до насыщения 0,5. Перемешивают 15 мин, центрифугируют 10 мин при 40 000 g и осадок отбрасывают. К центрифугату добавляют еще насыщенный раствор сульфата аммония (рН 8,5) до насыщения 0,75. Перемешивают 30 мин, центрифугируют 15 мин при 40 000 g, центрифугат отбрасывают; осадок растворяют в минимальном объеме 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,5).

Гель-фильтрация на сефадексе G-200. На колонку с сефадексом G-200 (1,5×50 см), уравновешенным 0,05 М трис-НСl буфером (рН 8,5), наносят ферментный раствор, полученный на предыдущей стадии. Элюцию белка осуществляют тем же буфером, собирая фракции по 2,5 мл со скоростью 3—4 мл/ч. Фракции элюата, содержащие транскетолазную активность, объединяют и хранят в замороженном состоянии при —16° С.

Определение активности

По убыли восстановленного НАД

Принцип метода, реактивы и ход работы те же, что указаны на с. 279, только в данном случае в реакционную смесь дополнительно добавляют 5 мМ ЭДТА, а вместо глицил-глицинового буфера — 0,05 М триэтаноламиновый буфер (указаны конечные концентрации), и не добавляют тиаминпирофосфат и хлористый магний.

По скорости восстановления НАД

Принцип метода, реактивы и ход работы те же, что указаны на с. 281, только из реакционной смеси исключают тиаминпирофосфат и хлористый магний.

По количеству образующегося седогептулозо-7-фосфата

Реактивы:

1. Триэтаноламиновый буфер — 0,04 М раствор, рН 7,8.
2. Раствор фосфопентоз (с. 282).
3. Транскетолаза — около 0,6 Е фермента в 1 мл.
4. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор.
5. Реактивы для определения седогептулозо-7-фосфата (с. 282).

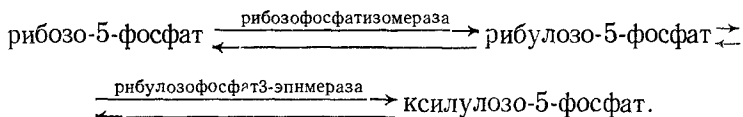
Процедура определения активности описана на с. 282, только вместо глицил-глицинового буфера берут триэтаноламиновый буфер. Добавление хлористого магния и тиаминпирофосфата в данном случае не требуется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетов Г. А. Транскетолаза: структура и механизм действия//Биохимия. 1986. Т. 51. Вып. 12. С. 2010.
2. Philippov P. P. et al. Characterization and properties of pig liver transketolase//Biochem. Biophys. acta. 1980. Vol. 613. P. 359.

18. ПОЛУЧЕНИЕ ФОСФОПЕНТОЗ

Смесь фосфопентоз, содержащую рибозо-5-фосфат, ксилулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат, получают энзиматически из рибозо-5-фосфата. В качестве ферментного препарата используют смесь рибозофосфатизомеразы и рибулозофосфат-3-эпимеразы. Под действием указанных ферментов в системе устанавливается следующее равновесие:



Образовавшуюся смесь фосфопентоз выделяют в виде бариевой соли.

Получение ферментного препарата

Реактивы:

1. Двухзамещенный фосфат натрия — 66 мМ раствор.
2. КОН — 2 н. раствор.
3. Ацетон, х. ч.
4. Ацетон технический.
5. Сухой лед.
6. Сульфат аммония, сухой.
7. Сульфат аммония — полунасыщенный раствор.

Ферментный препарат выделяют из пекарских дрожжей. Первоначальная процедура очистки, включая диализ осадка после обработки ацетоном, совпадает с той, которая используется при выделении транскетолазы (с. 283). Затем проводят следующие стадии обработки.

Тепловая обработка. Отдиализованный раствор ацетоновой фракции центрифугируют 5 мин при 25 000 g и осадок отбрасывают. Центрифугат разводят пятью объемами воды, предварительно нагретой до 60°C, нагревают на кипящей водяной бане до 60°C и помещают на 25 мин в водяной термостат при 60°C. Охлаждают в сосуде с тающим льдом и центрифугируют 5 мин при 18 000 g. Осадок отбрасывают.

Фракционирование сульфатом аммония. К центрифугату предыдущей стадии добавляют при помешивании сульфат аммония из расчета 29 г на каждые 100 мл раствора. Через 20 мин центрифугируют 10 мин при 40 000 g. Осадок отбрасывают, а к центрифугату добавляют сульфат аммония — 16,7 г на каждые 100 мл раствора. Через 30 мин центрифугируют при 40 000 g в течение 10 мин. Центрифугат отбрасывают, а осадок растворяют в 50 мл холодной воды. Добавляют сульфат аммония до 80%-ного насыщения и 2 М раствор КОН до pH 7,6. Оставляют при перемешивании на 30 мин, после чего центрифугируют 10 мин при 40 000 g. Центрифугат отбрасывают, а осадок растворяют в 50 мл холодной воды.

Осаждение сульфатом аммония повторяют еще 2—3 раза, после чего осадок суспендируют в 30 мл полунасыщенного раствора сульфата аммония. В таком виде ферментный препарат стабилен в течение нескольких недель при его хранении в холодильнике.

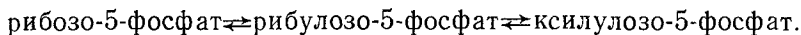
Получение смеси фосфопентоз

Реактивы:

1. Свежеприготовленный раствор аммонийной соли рибозо-5-фосфата. К 1,25 г бариевой соли рибозо-5-фосфата добавляют 12,5 мл 0,1 н. соляной кислоты и помещают на 4 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения удаляют барий с помощью раствора сульфата аммония; добавляют раствор гидроксида аммония до pH 7,6 и воду до конечного объема 20 мл.
2. Свежеприготовленный раствор ферментного препарата, содержащего рибозофосфатизомеразу и рибулозофосфат-3-эпимеразу. 12 мл суспензии ферментного препарата (с. 288) центрифугируют 15 мин при 40 000 g. Центрифугат отбрасывают, осадок растворяют в 5 мл холодной бидистиллированной воды. Диализуют при помешивании в течение 3 ч на холоде против 500 мл воды, которую за это время несколько раз меняют. Можно диализовать в течение ночи против 2 л воды. Осадок, выпавший при диализе, удаляют центрифугированием (10 мин при 25 000 g), к центрифугату добавляют холодную воду до общего объема 8 мл.
3. Реактивы для измерения транскетолазной активности (см. с. 279).
4. Реактивы для определения кетопентоз:
солянокислый цистеин — 1,2%-ный раствор;
 H_2SO_4 — семь объемов концентрированной H_2SO_4 на три объема воды;
карбазол — 0,1%-ный спиртовой раствор.
5. Трихлоруксусная кислота, 50- и 6,5%-ные растворы.

6. КОН — 4 н. раствор.
7. Уксуснокислый барий — 1 М раствор.
8. Этиловый спирт.
9. Ацетон, х. ч.

Прежде чем проводить препаративное получение фосфопентоз, ставят пробный эксперимент, чтобы определить время, требуемое для установления равновесия:



Необходимо также подобрать оптимальную концентрацию ферментного препарата. Все это диктуется, в частности, тем, что ферментные препараты наряду с рибозофосфатизомеразой и рибулозофосфат-3-эпимеразой, как правило, содержат примесь транскетолазы. За счет действия этого фермента часть ксилулозо-5-фосфата, образующегося из рибозо-5-фосфата, будет переходить в седогептулозо-7-фосфат. Его количество в реакционной смеси будет определяться не только соотношением вышеуказанных ферментов, но и их абсолютной концентрацией.

Постановка пробного эксперимента. В химические пробирки наливают по 0,8 мл раствора рибозо-5-фосфата, в одну из них — 0,2 мл основного ферментного раствора, в остальные — по 0,2 мл ферментного раствора, предварительно разведенного холодной водой в 2, 5, 10 и 20 раз. Перемешивают и ставят на инкубацию в водяной термостат при 38° С.

Энзиматический контроль за процессом образования ксилулозо-5-фосфата. Из инкубационной смеси сразу же после погружения пробирок в термостат, а также через каждые 30 мин отбирают по 0,1 мл, выливают в мерные пробирки и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Добавляют воду до 1 мл, перемешивают и центрифугируют. Осадок отбрасывают, а центрифугат (или часть его) переносят в спектрофотометрическую кювету, содержащую все необходимые компоненты для определения транскетолазной активности (с. 279), кроме субстрата. Скорость транскетолазной реакции в данном случае должна лимитироваться количеством ксилулозо-5-фосфата, образовавшимся в инкубационной смеси и добавляемым в спектрофотометрическую кювету в составе центрифугата.

Количество ксилулозо-5-фосфата в инкубационной пробе со временем увеличивается, что находит отражение в величине определяемой транскетолазной активности. Когда равновесие между фосфопентозами установится и количество ксилулозо-5-фосфата в инкубационной смеси перестанет нарастать, определяемая величина транскетолазной активности выйдет на стационарный уровень. Равновесие между фосфопентозами обычно устанавливается в течение 1—3 ч. Для препаративного получения фосфопентоз используют то время инкубации и то количество ферментного препарата, при которых в пробном эксперименте образовалось максимальное количество ксилулозо-5-фосфата.

Химический метод контроля за процессом образования кетофосфопентоз. В данном случае определяют суммарное содержание фосфопентоз (ксилулозо-5-фосфата и рибулозо-5-фосфата) в реакционной смеси по цветной реакции с карбазолом. Этот метод до некоторой степени приближителен, так как не позволяет точно определить время установления равновесия в системе между отдельными фосфопентозами. Последнее объясняется тем, что интенсивность окраски с карбазолом для рибулозо-5-фосфата в три раза выше, чем с ксилулозо-5-фосфатом.

Пробный эксперимент в данном случае ставится так же, как и при энзиматическом контроле за процессом образования ксилулозо-5-фосфата (с. 289). Отбираемые пробы (по 0,1 мл) смешивают с 0,9 мл 6,5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют и осадок отбрасывают, центрифугат разводят в пять раз водой. Отбирают пробы по 0,2, 0,5, 0,8 мл и каждую доводят водой до 0,8 мл. Добавляют по 0,2 мл солянокислого цистеина, 5 мл серной кислоты и после перемешивания — 0,2 мл 0,1%-ного раствора карбазола. Перемешивают и ставят на 40 мин в водяной термостат при 37° С. По прошествии указанного времени пробы охлаждают и интенсивность развившейся окраски определяют спектрофотометрически при 540 нм. Контрольные пробы содержат вместо исследуемого раствора 0,8 мл воды и обрабатываются, как указано выше.

Прекращение увеличения интенсивности окраски в опытных пробах, последовательно отбираемых из реакционной смеси пробного эксперимента, указывает на то, что образование фосфокетопентоз из рибозо-5-фосфата прекратилось.

Препаративное получение и выделение смеси фосфопентоз

16 мл аммонийной соли рибозо-5-фосфата смешивают с 4 мл диализованного ферментного раствора, содержащего рибозофосфатизомеразу и рибулозофосфат-3-эпимеразу, ставят в водяной термостат при 38° С. Через определенный промежуток времени (время инкубации и степень разведения ферментного раствора подбирают в пробном эксперименте, как указано выше) к реакционной смеси добавляют 3 мл 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют, осадок отбрасывают, рН центрифугата доводят 4 н. раствором щелочи до 8,0. Добавляют 5 мл 1 М раствора уксуснокислого бария и центрифугируют. Осадок дважды промывают небольшим количеством воды, предварительно доведенной до рН 8,0. Промывные воды объединяют с основным центрифугатом. К полученному раствору добавляют 4 объема 96%-ного этилового спирта, доводят рН до 8,0 и оставляют в холодильнике. Через 2—3 ч выпавший осадок собирают центрифугированием и дважды промывают сначала 96%-ным этиловым спиртом, затем ацетоном.

Полученный препарат бариевой соли фосфопентоз после высушивания в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием хранят в холодильнике в эксикаторе.

19. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ТРИОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗУ И ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗУ, ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

Реактивы:

1. Сульфат аммония — насыщенный раствор.
2. Сульфат аммония — насыщенный раствор, рН 7,5.
3. Сульфат аммония, порошок.
4. Гидроокись аммония — концентрированный раствор, разведенный водой в 2 раза.

Экстракция. Измельченную мышечную массу (с. 221) заливают равным объемом воды и оставляют на 10 мин при периодическом пе-

ремешивании. Центрифугируют 30 мин при 18 000 g (или отжимают через плотную ткань). Центрифугат сливают. Экстракцию повторяют, используя тот же объем воды, что и в первый раз. Осадок отбрасывают.

Первое фракционирование сульфатом аммония. К объединенным экстрактам, доведенным до pH 7,5, добавляют насыщенный раствор сульфата аммония (pH 7,5) до насыщения 0,52. Оставляют на сутки при периодическом помешивании.

По прошествии указанного времени отбирают небольшой объем ферментного раствора, центрифугируют 10 мин при 40 000 g и в центрифугате измеряют фруктозоdifосфатальдозную активность (с. 246). Если она обнаруживается (в противном случае концентрацию сульфата аммония в основном ферментативном растворе сразу доводят до насыщения 0,72; см. ниже), к основному ферментному раствору добавляют еще насыщенный раствор сульфата аммония (pH 7,5) до получения конечной концентрации, равной насыщению 0,54. Оставляют на 2 ч при периодическом перемешивании, после чего центрифугируют 15 мин при 40 000 g (можно фильтровать, используя большие химические воронки и оставлять на ночь).

Осадок отбрасывают, а к центрифугату добавляют при перемешивании измельченный сульфат аммония до насыщения 0,72. Через 15 мин центрифугируют (40 000 g, 20 мин), центрифугат отбрасывают.

Второе фракционирование сульфатом аммония. Осадок, полученный на предыдущей стадии, растворяют в воде (приблизительно 200 мл воды на 1 кг мышц, взятых для работы), pH раствора доводят гидроокисью аммония до 7,5 и добавляют насыщенный раствор сульфата аммония (pH 7,5) до насыщения 0,52. Оставляют в холодильнике на ночь.

Центрифугируют 15 мин при 40 000 g, осадок отбрасывают, к центрифугату добавляют сухой сульфат аммония до насыщения 0,72. Через 15 мин центрифугируют 20 мин при 40 000 g и центрифугат отбрасывают.

Третье фракционирование сульфатом аммония. Осадок, полученный на предыдущей стадии, растворяют в холодной воде (около 200 мл на 1 кг первоначального веса мышц), pH раствора доводят до 6,0. Добавляют холодный насыщенный раствор сульфата аммония до насыщения 0,64.

Оставляют на 30 мин, после чего центрифугируют 20 мин при 40 000 g. Центрифугат отбрасывают, осадок растворяют в небольшом объеме холодной воды, pH раствора доводят до 7,6.

Полученный препарат ферментов в замороженном виде не теряет своих каталитических свойств в течение нескольких месяцев.

Сульфатно-аммонийную фракцию насыщением 0,52—0,64 можно не растворять в воде, а суспендировать в минимальном объеме раствора сульфата аммония насыщением 0,64 (pH 7,6) и в таком виде хранить в холодильнике при 0—4° С. Активность ферментов практически не меняется в течение нескольких месяцев.

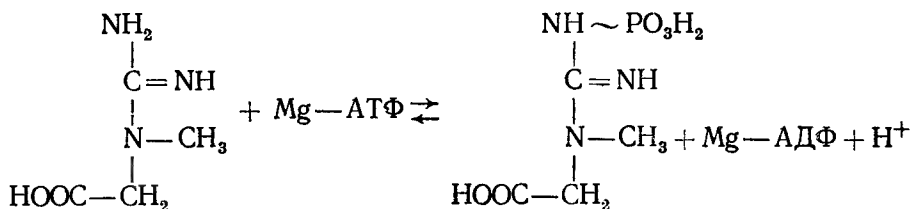
20. КРЕАТИНКИНАЗА²

(АТР: КРЕАТИНФОСФОТРАНСФЕРАЗА, КФ 2.7.3.2)

Креатинкиназа катализирует обратимую реакцию переноса фосфорильной группы с АТФ на креатин с образованием богатых энергией

² Работа предложена Л. В. Белоусовой.

соединений креатинфосфата и АДФ:



В клетках различных млекопитающих креатинкиназа присутствует в виде трех цитоплазматических изоферментов (мышечного, мозгового и митохондриального), а также в виде митохондриального изофермента.

С открытием митохондриальной креатинкиназы креатинфосфат стал рассматриваться не просто как резерв макроэргического фосфата в клетке, а как основной переносчик химической энергии от митохондрий к местам ее утилизации в клетке. Митохондриальная креатинкиназа превращает синтезированный в митохондриях АТФ в креатинфосфат; в виде креатинфосфата энергия транспортируется к местам ее утилизации, где и происходит обратная реакция образования АТФ из креатинфосфата и АДФ с помощью цитоплазматических изоферментов.

Все цитоплазматические креатинкиназы обладают близкими молекулярными массами, коэффициентами седиментации. Они состоят из двух полипептидных цепей, молекулярная масса которых равна 40 000—43 000 Да.

Митохондриальный фермент выделен в виде димера, гексамера и октамера. Изоферменты креатинкиназы различаются по электрофоретической подвижности, по кинетическим свойствам, по термостабильности, по аминокислотному составу, по количеству и реактивности SH-групп, аргининовых остатков и другим свойствам. Мышечный изофермент (ММ) более стабилен, чем мозговой (ВВ) и митохондриальный при изменении pH и температуры. Они устойчивы в диапазоне pH 6,0—9,5, но при этом к раствору мозгового и митохондриального изоферментов необходимо добавлять SH-восстанавливающие реагенты (2-меркаптоэтанол и др.). Оптимальные значения pH активности для изоферментов практически одинаковы и равны: 9 — для прямой реакции (синтез креатинфосфата) и 7 — для обратной реакции (расщепления креатинфосфата).

Активаторами реакции являются Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ; HCO_3^- , HCO_2^- , NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , Br^- , F^- являются ингибиторами ферментов, так как занимают место фосфорильной группы, которая переносится в реакции трансфосфорилирования и образуют аналог комплекса переходного состояния ($\text{E}-\text{Mg}-\text{АДФ}-\text{NO}_3^-$ —креатин).

Величины кажущихся констант Михаэлиса для субстратов колеблются в зависимости от природы используемого буфера, pH, температуры, источника выделения фермента и прочих условий. Кажущиеся константы Михаэлиса цитоплазматических креатинкиназ равны: для $\text{Mg}-\text{АТФ}$ —0,5—1,0 мМ; $\text{Mg}-\text{АДФ}$ —0,2—0,8 мМ; для креатина — 16—20 мМ; для креатинфосфата — 4—8 мМ. Для митохондриальных креатинкиназ эти показатели равны: для $\text{Mg}-\text{АТФ}$ —0,06—0,7 мМ; для $\text{Mg}-\text{АДФ}$ —0,02—0,06 мМ; для креатина — 4—6 мМ; для креатинфосфата — 0,2—0,8 мМ.

Определение активности креатинкиназы

Химический метод

Активность определяют по начальной скорости обратной реакции:
 $\text{креатинфосфат} + \text{Mg} - \text{АДФ} \rightleftharpoons \text{креатин} + \text{Mg} - \text{АТФ}$.

Креатин, образующийся в реакции, определяют колориметрически после образования окрашенного комплекса с диацетилем в присутствии α -нафтола. Некоторые компоненты среды для определения активности (например, глицил-глициновый или трис- HCl буфер) влияют на интенсивность окраски и это необходимо учитывать при определении креатина и построения калибровочной кривой.

Реактивы:

1. Трис- HCl — 100 мМ раствор, рН 7,2.
2. Креатинфосфат — 100 мМ раствор.
3. АДФ — 10 мМ раствор, рН 7,0.
4. АМФ — 100 мМ раствор, рН 7,0.
5. α -нафтол — 1%-ный раствор.
6. Диацетил — 0,05%-ный раствор.
7. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ — 100 мМ раствор.
8. Креатинкиназа — 2 мг/мл. В 50 мМ растворе трис- HCl буфера (рН 7,2) хранят в замороженном состоянии, перед определением активности однократно размораживают и разводят тем же буфером.

В реакционную смесь объемом 5 мл добавляют компоненты ферментативной реакции в конечной концентрации: 50 мМ трис- HCl , рН 7,2; 10 мМ креатинфосфат; 10 мМ АМФ, 5 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, раствор креатинкиназы. Если в препарате фермента отсутствует примесь аденилаткиназы, АМФ в реакционную смесь не добавляют. Смесь выдерживают 5 мин при 30°С, после чего реакцию запускают добавлением АДФ (1 мМ), быстро перемешивают и затем каждые 2—3 мин отбирают по 0,5 мл раствора. Пробы помещают в заранее приготовленную смесь, состоящую из 1 мл 1%-ного щелочного раствора α -нафтола и 0,5 мл 0,05%-ного раствора диацетила. Каждую пробу после доведения ее объема до 5 мл через 30 мин колориметрируют при 540 нм. Первая проба (взятая в течение первых 20 с) может служить контрольной, но лучше ее готовить без добавления АДФ.

Энзиматические методы

А. По нарастанию образующего АДФ в прямой реакции

Концентрацию АДФ измеряют в сопряженной с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой системе по количеству образовавшегося НАД по следующей схеме:



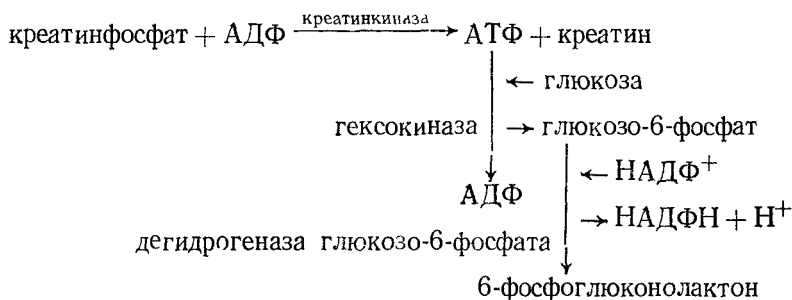
Реактивы:

1. Глицил-глициновый буфер — 150 мМ раствор, рН 7,0.
2. Креатин — 75 мМ раствор.
3. АТФ — 50 мМ раствор, рН 7,0.
4. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ — 100 мМ раствор.
5. Фосфоенолпируват — 15 мМ раствор, рН 7,5.
6. НАДН — 3 мМ раствор, рН 7,5.
7. Пируваткиназу, лактатдегидрогеназу и креатинкиназу растворяют в 50 мМ глицил-глициновом буфере, рН 8,0.
8. Дитиотреитол — 30 мМ раствор.

В спектрофотометрическую кювету вносят следующие компоненты реакции (указаны конечные концентрации): 50 мМ глицил-глициновый буфер, рН 8,0; 25 мМ креатин; 5 мМ АТФ; 10 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 0,1 мМ НАДН; 0,5 мМ фосфоенолпируват; 0,2—1 мМ дитиотреитол, пируваткиназу 0,4 ед/мл, лактатдегидрогеназу 0,4 ед/мл. Реакцию начинают добавлением креатинкиназы. Измеряют уменьшение оптической плотности НАДН при 340 нм.

Б. По нарастанию образующегося АТФ в обратной реакции

Концентрацию АТФ измеряют в сопряженной энзиматической системе с гексокиназой и дегидрогеназой глюкозо-6-фосфата по количеству образующегося НАДФН по следующей схеме:



Реактивы:

1. Трис-НСl буфер — 100 мМ раствор, рН 7,2.
 2. Креатинфосфат — 200 мМ раствор.
 3. АДФ — 20 мМ раствор, рН 7,0.
 4. $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ — 600 мМ раствор.
 5. АМФ — 200 мМ раствор, рН 7,0.
 6. Глюкоза — 40 мМ раствор.
 7. НАДФ — 5 мМ раствор, рН 7,0.
 8. Дитиотреитол — 30 мМ раствор.
 9. Креатинкиназа.
 10. Гексокиназа.
 11. Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата.
- Ферменты растворяют в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,2.

В спектрофотометрическую кювету вносят следующие компоненты (указаны конечные концентрации): 50 мМ трис-НСl, рН 7,2; 1,0 мМ АДФ; 30—10 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 2 мМ глюкозу; 0,25 мМ НАДФ; гексокиназу 0,5 ед/мл; дегидрогеназу глюкозо-6-фосфата 0,5 ед/мл, креатинкиназу. Следят за изменением оптической плотности: если из-

менения существенны, вносят 10 мМ АМФ для ингибирования аденилаткиназы, которая часто бывает в препаратах гексокиназы. Затем реакцию начинают добавлением креатинфосфата. Измеряют нарастающие оптической плотности НАДФН при 340 нм.

Выделение и очистка креатинкиназы из скелетных мышц кролика

Реактивы:

1. KCl — 0,01 М раствор, 0,3 М раствор.
2. NH_4Cl — сухой, х. ч.
3. NaCl — сухой, технический.
4. NH_4OH — 5 М раствор.
5. Этанол — 95—98%-ный, перегнанный.
6. Глицин-NaOH буфер — 0,01 М раствор, pH 9,0.
7. Трис-HCl буфер — 0,05 М раствор, pH 8,0.
8. ДЭАЭ-целлюлоза.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде. Работу проводят при 0—4° С, посуду и растворы заранее охлаждают.

Экстракция. Измельченную мышечную массу в количестве 200—300 г (приготовление см. на с. 221) заливают двойным объемом 0,01 М KCl, тщательно перемешивают, гомогенизируют в течение 3 мин с перерывами, следя за тем, чтобы смесь не нагревалась. Густой гомогенат перемешивают в течение 15 мин, затем фильтруют через 4 слоя влажной марли.

Очистка экстракта этанолом и тепловая денатурация балластных белков. Измерив объем фильтрата, помещают его в охлаждающую смесь (лед — NaCl), добавляют при постоянном перемешивании сухой NH_4Cl до конечной концентрации 0,1 М, затем доводят pH экстракта до 9,0, осторожно приливая 5 М NH_4OH . Перемешивают 30 мин, добавляют 1,5 объема охлажденного до —10° С — (—20° С) этилового спирта. Спирт добавляют медленно, по каплям из делительной воронки, перемешивая экстракт и следя за тем, чтобы температура смеси не повышалась выше 0—2° С. Затем температуру смеси постепенно доводят на водяной бане до 20° С. Оставляют при этой температуре на 2—2,5 ч, постоянно перемешивая. Выпавший денатурированный белок удаляют центрифугированием в течение 30 мин при 1000 g. Центрифугат оставляют на ночь в холодильнике.

Осаждение креатинкиназы спиртом. Выпавший за ночь небольшой осадок удаляют центрифугированием при 1000 g в течение 30 мин. Из прозрачного центрифугата осаждают креатинкиназу, доводя концентрацию этанола до 70 об.%, тщательно следя за тем, чтобы температура смеси не поднималась выше 0—2° С. Осадок фермента собирают центрифугированием при 2000 g в течение 20 мин, растворяют в небольшом объеме 0,01 М глицин-NaOH буфера, pH 9,0 (или в 0,05 М трис-HCl буфере, pH 8,0).

Диализ. Раствор фермента диализуют против 0,01 М глицин-NaOH буфера, pH 9,0, в течение 48 ч с 4-кратной сменой буфера. Небольшой осадок, образовавшийся в мешочке для диализа, удаляют центрифугированием при 1000 g. Прозрачный центрифугат препарата фермента разливают по небольшим порциям, замораживают и хранят при —10° С — (—20° С).

Ионообменная хроматография. Фермент, полученный вышеописанным методом, обладает 85—95%-ной чистотой. Для получения более

гомогенного препарата проводят ионообменную хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (2×20 см), уравновешенной 0,05 М трис-HCl буфером, pH 8,6. Раствор белка предварительно диализуют против этого буфера в течение 12—16 ч. Креатинкиназа выходит в свободном объеме колонки при элюции этим же буфером, тогда как примеси связываются с ДЭАЭ-целлюлозой. На колонку можно наносить 70—250 мг белка. Связавшиеся примеси удаляют пропусканием через колонку 0,2—0,3 М KCl в том же буфере. Скорость тока жидкости через колонку — 0,5 мл/мин, объем каждой фракции — 3—4 мл. Фракции, содержащие креатинкиназу, хранят в замороженном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Лызлова С. Н. Фосфагениказы М, 1974.
- 2 Четверикова Е. П. и др. Состав и кинетические свойства креатинкиназы из скелетных мышц//Биохимия 1970. Т. 35. С. 953.
- 3 Watts D. C. Creatine Kinase//The Enzymes. N. Y., 1973. Vol. 8. P. 383.
- 4 Bickerstaff G. F., Price N. C. Creatine Kinase: a review of recent works on the mechanism and subunit behavior of the enzyme//Intern. J. Biochem. 1978. Vol. 9. P. 1.
5. Kenyon G. L., Reed G. H. Creatine Kinase — structure activity relations//Adv. Enzymol. N. Y., 1983. Vol. 54. P. 367.

IV. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА BrCN-СЕФАРОЗЕ

1. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ BrCN-АКТИВИРОВАННОЙ СЕФАРОЗЫ

Реактивы:

1. Бром (Br_2) (при работе с бромом необходимо соблюдать меры предосторожности).
2. KCN (или NaCN) — 2,8 М раствор.
3. 0,1 М Na-фосфат, pH 11.
4. 0,1 М Na-фосфат, содержащий 5 мМ ЭДТА, pH 8,3.
5. K_3PO_4 — 1 М раствор, pH 11.
6. Диоксан (перегнанный).

Для активации сефарозы используют коммерческие препараты BrCN или синтезированный в лаборатории BrCN. Синтезированный BrCN может использоваться в течение 1—3 дней.

Внимание! Все работы с цианидами (KCN, NaCN, BrCN), в том числе процедуры по синтезу и дальнейшему использованию BrCN, необходимо производить в специально приспособленных помещениях с мощными вытяжными шкафами в соответствии с инструкциями.

Синтез BrCN. В круглодонную колбу на 50 мл вносят 0,2 мл дистиллированной воды, 2,6 мл Br_2 и магнит в стеклянной оболочке для перемешивания. Горлышко колбы закрывают притертой делительной воронкой. Колбу устанавливают в ледяной бане на магнитную мешалку и при осторожном перемешивании охлаждают. Делительную воронку заполняют раствором KCN на воде (20 мл) и по каплям добавляют его к бромю при постоянном перемешивании. В процессе до-

бавления раствора KSCN красно-коричневый цвет жидкости в колбе переходит в желтый, а затем в белый. Одновременно в колбе выпадает белый осадок кристаллов BrCN. При появлении белой окраски добавление KSCN прекращают, а перемешивание продолжают еще в течение 10 мин. BrCN перегоняют при температуре 80—90° С в глицериновой бане в сухую круглодонную двугорлую колбу.

Активация сефарозы. Сефарозу 4В промывают на стеклянном фильтре (типа G-3) 10-кратным объемом 0,1 М Na-фосфата (рН 11), затем бидистиллированной водой до нейтральных значений рН. Слегка подсушенную на фильтре током воздуха сефарозу взвешивают и заливают 1 М K_3PO_4 (рН 11): 1 мл на 1 г сефарозы. К полученной суспензии, предварительно охлажденной до 4° С, добавляют при постоянном перемешивании раствор BrCN в воде (5%) или в диоксане (20%) из расчета 5 мг BrCN на 1 г сефарозы. После 7-минутной инкубации суспензию сефарозы переносят на стеклянный фильтр и быстро промывают сначала 20-кратным объемом охлажденной бидистиллированной воды, затем 20-кратным объемом 0,1 М Na-фосфата, содержащего 5 мМ ЭДТА, рН 8,3.

Полученные препараты активированной сефарозы используют для иммобилизации НАД-зависимых дегидрогеназ. При данной степени активации тетрамерные молекулы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы связываются с матрицей только через одну из субъединиц. Для связывания ферментов за несколько субъединиц и для получения иммуносорбентов препараты сефарозы активируют большим количеством BrCN: 50—250 мг на 1 г сефарозы. Для поддержания постоянных значений рН в процессе активации сефарозы при степени активации 50—70 и 200—250 мг BrCN на 1 г сефарозы следует использовать соответственно 2 М и 4 М K_3PO_4 , рН 11. При высоких степенях активации предпочтительно использовать раствор BrCN в диоксане, а не в воде, так как в первом случае его растворимость значительно выше.

2. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Реактивы:

1. Na-фосфат — 0,1 М раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА, рН 8,0 (буфер А).
2. Раствор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей или скелетных мышц кролика в буфере А — концентрация 0,7—1,2 мг/мл.
3. Раствор лактатдегидрогеназы в буфере А — концентрация 0,7—1,1 мг/мл.
4. Раствор фосfogлицераткиназы в буфере А — концентрация 0,7—1,2 мг/мл.
5. Глицин.

Растворы ферментов готовят непосредственно перед проведением иммобилизации: суспензию фермента в сульфате аммония растворяют в буфере А (предпочтительно отцентрифугировать кристаллы фермента и их растворить в буфере А), затем обессоливают на колонке с сефадексом G-25 или G-50, уравновешенным тем же буфером. Оптимальная концентрация фермента — около 1 мг/мл. Повышение концентрации

белка нецелесообразно, так как в этом случае количество связанного с сефарозой белка увеличивается незначительно. Понижение концентрации белка в случае олигомерных НАД-зависимых дегидрогеназ приводит к диссоциации этих ферментов на димеры, и последующая иммобилизация таких препаратов не позволяет получить связанные с матрицей тетрамеры дегидрогеназ.

К активированной сефарозе добавляют равный объем раствора фермента (1 мл на 1 г сефарозы) и инкубируют при комнатной температуре в течение 2,5—3,0 ч при перемешивании. К суспензии добавляют сухой глицин до конечной концентрации 50 мМ и оставляют при перемешивании в холодной комнате на ночь. Сефарозу отмывают в колонке или на стеклянном фильтре буфером А от неспецифически адсорбировавшегося белка и глицина до исчезновения в элюате поглощения при 280 нм и прекращения активности фермента.

Для выполнения задач по получению иммобилизованных субъединиц глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы иммобилизацию проводят на сефарозе, активированной низкими концентрациями BrCN (3—5 мг BrCN на 1 г геля).

Иммуносорбенты на основе иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей получают при степени активации сефарозы 150 мг BrCN на 1 г геля.

Лактатдегидрогеназу, используемую для регенерации кофактора, и фосfogлицераткиназу иммобилизуют при степени активации 50 и 30 мг BrCN на 1 г геля сефарозы.

Перед использованием иммобилизованных ферментов в дальнейшей работе (а также для определения белка и активности в препаратах) готовят исходную суспензию. Для этого гель сефарозы промывают нужным буфером, центрифугируют в мерных цилиндрах при 1000 g в течение 1 мин и к осевшему гелю добавляют буфер из расчета 1 мл на 1 мл геля. Перед отбором проб из суспензии ее каждый раз тщательно перемешивают. При хранении суспензии к ней добавляют дитиотреитол в конечной концентрации 1—2 мМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В. и др. Иммобилизованные ферменты. М., 1976. Т. 1, 2.
2. Введение в прикладную энзимологию. М., 1982.
3. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. М., 1983.
4. Methods in Enzymology. N. Y., 1976. Vol. 44.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Активность иммобилизованных ферментов можно определить практически всеми известными методами (непрерывными и периодическими, спектрофотометрическими, рН-метрическим, флуоресцентными, химическими и др.). При работе с иммобилизованными ферментами необходимо постоянно перемешивать реакционную смесь в процессе измерения активности, так как в противном случае по мере оседания частиц носителя активность будет уменьшаться. При определении активности ферментов методом отбора проб обычное осаждение белка (например, трихлоруксусной кислотой) в случае иммобилизованных препаратов можно заменить отделением фермента фильтрованием или центрифугированием.

Определение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Активность фермента определяют спектрофотометрически по нарастанию оптической плотности при 340 нм за счет образования НАДН из НАД.

Реактивы:

1. Глициновый буфер — 0,1 М раствор, рН 9,5.
2. Трис-НСl буфер — 0,05 М раствор, рН 8,0.
3. НАД — 60 мМ раствор.
4. 3-фосфоглицериновый альдегид — 45 мМ раствор.
5. Арсенат натрия — 0,15 М раствор.
6. ЭДТА — 0,15 М (можно приготовить смесь ЭДТА и арсената натрия указанных концентраций и довести рН смеси до 7,5).

При определении активности иммобилизованной дегидрогеназы из скелетных мышц кролика используют буфер с рН 9,5, а для фермента из дрожжей — буфер с рН 8,0. Реакционная смесь общим объемом 3 мл содержит 0,1—0,2 мл суспензии иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (2—20 мкг фермента) и следующие компоненты (даны конечные концентрации): 3-фосфоглицериновый альдегид — 1,5 мМ, НАД — 2 мМ, арсенат натрия — 5 мМ, ЭДТА — 5 мМ, глициновый буфер — 0,1 М, рН 9,5 (для фермента из мышц кролика) или трис-НСl буфер — 0,05 М, рН 8,0 (для фермента из дрожжей). Реакцию начинают добавлением 3-фосфоглицеринового альдегида и при непрерывном перемешивании определяют скорость образования НАДН в течение 1—2 мин.

Определение активности лактатдегидрогеназы

Активность фермента определяют спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при 340 нм за счет окисления НАДН.

Реактивы:

1. Калий-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,4.
2. ЭДТА — 30 мМ раствор.
3. НАДН — 60 мМ раствор.
4. Пируват — 24 мМ раствор.

Реакционная смесь общим объемом 3 мл содержит 0,1—0,2 мл суспензии иммобилизованной лактатдегидрогеназы (2—30 мкг белка фермента) и следующие компоненты (даны конечные концентрации): ЭДТА — 1 мМ, НАДН — 2 мМ, пируват — 0,8 мМ, К-фосфат — 0,1 М, рН 7,4. Реакцию начинают добавлением пирувата и при непрерывном перемешивании определяют убыль НАДН по уменьшению оптической плотности (с. 388).

Определение активности фосфоглицераткиназы

Активность фосфоглицераткиназы определяют в сопряженной системе в присутствии избытка глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы по уменьшению концентрации НАДН.

1. Триэтаноламин — 0,1 М раствор, pH 7,5.
2. НАДН — 60 мМ раствор.
3. АТФ — 90 мМ раствор.
4. 3-фосфоглицериновая кислота — 0,5 М раствор.
5. MgSO_4 — 0,5 М раствор.
6. Раствор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы — 300 ед/мл (2—5 мг/мл).

Реакционная смесь общим объемом 3 мл содержит 0,1—0,2 мл суспензии иммобилизованной фосфоглицераткиназы и следующие компоненты (даны конечные концентрации): НАДН — 2 мМ, АТФ — 3 мМ, 3-фосфоглицериновая кислота — 16 мМ, MgSO_4 — 16 мМ, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа — 10 ед. на пробу. Реакцию начинают добавлением 3-фосфоглицериновой кислоты и при непрерывном перемешивании определяют убыль НАДН по уменьшению оптической плотности (с. 388).

4. ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ СУБЪЕДИНИЦ ОЛИГОМЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Препараты олигомерных ферментов, связанных с матрицей через одну из субъединиц, могут быть использованы для получения иммобилизованных форм ферментов разной степени олигомерности. Сравнение каталитических свойств этих форм и их стабильности позволяет сделать выводы о роли четвертичной структуры в функционировании ферментов-олигомеров. Диссоциация олигомерного иммобилизованного фермента может быть индуцирована специфическими воздействиями (например, диссоциация иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей на димеры) или обработкой денатурирующими реагентами (например, мочевиной).

Получение денатурированных иммобилизованных субъединиц глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Перед проведением экспериментов по получению форм дегидрогеназы разной степени олигомерности необходимо доказать, что исходный тетрамер связан с матрицей только через одну из субъединиц. Для этого необходимо обработать иммобилизованные препараты фермента в жестких условиях: их подвергают длительной инкубации в 8 М мочеvine, затем удаляют денатурированные и перешедшие в раствор субъединицы и определяют содержание белка до и после обработки. Используя препараты BrCN-активированной сефарозы, полученные при разной концентрации BrCN, можно показать, что в зависимости от степени активации сорбента изменяется число субъединиц фермента, вовлеченных в ковалентную связь с матрицей.

Реактивы:

1. Мочевина — 8 М раствор.
2. Na-фосфат — 0,1 М раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, pH 8,3.
3. Суспензия сефарозы с иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой — из дрожжей или скелетных мышц (крылика или крысы).

Разные препараты иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (степень активации сефарозы — от 3 до 250 мг ВгСН на 1 г геля) промывают на стеклянном фильтре 0,1 М Na-фосфатом, затем 5-кратным объемом 8 М раствора мочевины. К осажденному центрифугированием гелю сефарозы добавляют равный объем 8 М мочевины и инкубируют при перемешивании в течение 20 ч на холоде. Препараты промывают 5-кратным объемом 8 М раствора мочевины, а затем отмывают от нее и от денатурировавшего и перешедшего в раствор белка, связанного с сефарозой, до и после обработки мочевиной. Рассчитывают число субъединиц, вовлеченных в ковалентную связь с носителем.

Для последующих экспериментов по получению иммобилизованных субъединиц используют те препараты, в которых тетрамер глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы связан с матрицей только через одну субъединицу.

Получение нативных иммобилизованных димеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей

Растворимая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа из дрожжей при инкубации на холоде в присутствии АТФ и хлористого натрия диссоциирует на димеры и теряет свою активность. Диссоциация тетрамера иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы позволяет получить связанные с матрицей димеры и исследовать их свойства. Стабилизирующее действие носителя приводит к получению димеров, сохранивших нативную конформацию.

Цель задачи — получить иммобилизованные димеры и сравнить их свойства со свойствами иммобилизованных тетрамеров.

Реактивы:

1. Суспензия глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, связанной с сефарозой через 1 субъединицу.
2. Na-фосфат — 0,1 М раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, pH 8,3.
3. АТФ — 100 мМ раствор, приготовленный на 0,15 М NaCl, содержащем 5 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, pH 7,5.

Препараты иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы промывают 10-кратным объемом 0,15 М NaCl. Добавляют к осажденному центрифугированием гелю равный объем раствора АТФ и инкубируют суспензию при 4°С в течение 2 ч. После окончания инкубации препараты промывают 0,1 М Na-фосфатом для отделения денатурированного белка и АТФ до полного исчезновения поглощения элюата при 260 и 280 нм. В полученных препаратах иммобилизованных димеров определяют активность и содержание белка. Такого рода определения можно проводить и в процессе инкубации с АТФ для выяснения особенностей протекания процесса диссоциации иммобилизованного тетрамера.

При инкубации иммобилизованных димеров в течение 1 ч при температуре 25°С в присутствии апофермента дегидрогеназы из дрожжей в концентрации 0,15—0,20 мг/мл в 0,1 М Na-фосфате (pH 7,2) наблюдается реассоциация дегидрогеназы до тетрамеров. Эффективность реассоциации (после инкубации с растворимым ферментом и отмыва-

ния изолика фермента) может быть установлена на основании измерения активности и белка в препарате.

Получение нативных иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей и лактатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика

При обработке иммобилизованных тетрамеров дегидрогеназ 8 М раствором мочевины могут быть получены ковалентно связанные с сефарозой мономеры. Однако в процессе длительной инкубации в мочевины они теряют активность из-за денатурации. Подбирая концентрацию мочевины и время инкубации, можно провести избирательную денатурацию всех субъединиц тетрамера дегидрогеназы, за исключением той, которая связана с матрицей ковалентно, так как за счет стабилизирующего действия матрицы именно эта субъединица является наиболее устойчивой к действию мочевины.

Цель задачи — используя растворы мочевины разной концентрации, подобрать оптимальные условия для получения иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы и исследовать каталитические свойства этих мономеров, сравнив их со свойствами иммобилизованных форм другой степени олигомерности.

Реактивы:

1. Суспензия иммобилизованной лактатдегидрогеназы, связанной с матрицей через 1 субъединицу.
2. Суспензия иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей, связанной с матрицей через 1 субъединицу.
3. Na-фосфат — 0,1 М раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол, pH 8,3.
4. Растворы мочевины концентрации 1 М, 2 М, 3 М, 4 М, 5 М, 6 М, 7 М и 8 М, приготовленные на вышеуказанном растворе Na-фосфата, pH 7,5.

Суспензию сефарозы с иммобилизованной дегидрогеназой промывают 10-кратным объемом раствора мочевины, смешивают с 4-кратным объемом раствора мочевины той же концентрации и инкубируют суспензию при перемешивании. За ходом инактивации следят, измеряя активность фермента на носителе. Через каждые 10 мин из инкубационной смеси отбирают аликвоты препарата дегидрогеназы и без отмывания геля от мочевины вносят их в стандартную систему для определения активности. Реакцию начинают добавляением субстрата через 10 с после внесения суспензии сефарозы. Исследуют влияние концентрации мочевины на процесс инактивации фермента. Оптимальной концентрацией мочевины является такая, которая позволяет провести денатурацию 3 из 4 субъединиц дегидрогеназы и перевести эти субъединицы в раствор. Подбирая концентрацию мочевины, следует получить такую зависимость инактивации фермента от времени, на которой будет выражено плато на уровне 25% от исходной активности. При определении белка и активности на разных стадиях денатурации можно показать, что в начале плато в связанном с матрицей состоянии находится димер дегидрогеназы, сохраняющий 50% от исходной удельной активности. При сохранении в процессе инкубации активности такого димера происходит постепенное отщепление неактивной субъ-

единицы, а в связанном с матрицей состоянии остается активный номер дегидрогеназы. Препарат иммобилизованного мономера отмывают от мочевины и денатурированного белка Na-фосфатом. Проводят сравнение каталитических характеристик иммобилизованных мономеров и тетрамеров.

Доказательством получения иммобилизованных мономеров служит их способность к реассоциации с растворимыми субъединицами с восстановлением тетрамерной структуры. Для реассоциации необходимо провести инкубацию иммобилизованных тетрамеров с денатурированными растворимыми субъединицами дегидрогеназы.

Реассоциация иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей с растворимыми субъединицами

Для получения растворимых денатурированных субъединиц апофермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей в концентрации 2,5—3,5 мг/мл инкубируют в течение 1 ч в 8 М растворе мочевины (за полнотой денатурации следят по изменению активности фермента). Полностью денатурированные субъединицы добавляют к суспензии иммобилизованных мономеров в 8-кратном избытке по отношению к связанному с сефарозой белку. Эту процедуру проводят трижды с 30-минутными интервалами между добавками при постоянном перемешивании и температуре 25° С. Несвязавшийся белок отмывают 0,1 М Na-фосфатом. Определяют содержание белка и активность в препарате после реассоциации.

5. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФОСФОГЛИЦЕРАТКИНАЗЫ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СИНТЕЗА 1,3-ДИФОСФОГЛИЦЕРАТА

Иммобилизацию фосфоглицераткиназы проводят, как описано выше, используя препараты сефарозы, активированные 30 мг ВгСN на 1 г геля. Препараты иммобилизованной фосфоглицераткиназы могут быть использованы для синтеза 1,3-дифосфоглицерата и для определения активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в реакции восстановительного дефосфорилирования 1,3-дифосфоглицерата.

Реактивы:

1. Суспензия иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в Na-фосфате буфере (0,1 М, pH 8,3) — буфер А.
2. Суспензия иммобилизованной фосфоглицераткиназы в буфере А (1 : 1).
3. Триэтаноламин — 100 мМ раствор, pH 7,5.
4. НАДН — 60 мМ раствор.
5. АТФ — 180 мМ раствор.
6. 3-фосфоглицериновая кислота — 0,5 М раствор.
7. $MgSO_4$ — 0,5 М раствор.

Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы определяют, используя сопряженную систему, в которой синтез 1,3-дифосфоглицерата осуществляют с помощью иммобилизованной фосфоглицераткиназы. В пробу объемом 3 мл вносят 0,1—0,3 мл суспензии иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и 0,1 мл суспензии иммобилизованной фосфоглицераткиназы (10—20 единиц активности). Концентрации остальных компонентов следующие: НАДН — 2 мМ,

АТФ — 6 мМ, MgSO_4 — 16 мМ, 3-фосфоглицериновая кислота — 16 мМ.

Реакцию начинают внесением 3-фосфоглицериновой кислоты и измеряют спектрофотометрически снижение концентрации НАДН при постоянном перемешивании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муронец В. И., Наградова Н. К. Имобилизованные олигомерные ферменты. М., 1984.
2. Муронец В. И., Чередникова Т. В., Наградова Н. К. Использование иммобилизации для изучения глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Имобилизованные тетрамеры//Биохимия. 1981. Т. 46, № 10. С. 1731.
3. Муронец В. И., Головина Т. О., Наградова Н. К. Использование иммобилизации для изучения глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Имобилизованные димеры//Биохимия. 1982. Т. 47, № 1. С. 3.
4. Муронец В. И., Ашмарина Л. И., Асриянц Р. А. и др. Использование иммобилизации для изучения глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Имобилизованные мономеры//Биохимия. 1982. Т. 47, № 6. С. 977.

6. ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОСОРБЕНТОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ОЧИСТКИ АНТИТЕЛ

Имобилизованные ферменты могут быть использованы в качестве иммуносорбентов для выделения из антисыворотки специфических антител на эти ферменты. Эффективность адсорбции антител, количество адсорбированных антител и условия их элюции зависят от свойств иммуносорбента: от количества связанного с матрицей белка-антигена, прочности связи антиген—носитель, конформации антигена и числа вовлеченных в ковалентное связывание субъединиц антигенов-олигомеров.

Цель задачи — исследовать эффективность очистки антител из антисыворотки на иммуносорбентах, полученных при иммобилизации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на препаратах сефарозы, активированных при разной концентрации BrCN .

Реактивы:

1. Препараты глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей, иммобилизованной при степени активации сефарозы 3, 50 и 150 мг BrCN на 1 г геля.
2. Антисыворотка, полученная у кроликов, иммунизированных глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из дрожжей.
3. NaCl — 0,15 М раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА, pH 7,2.
4. Глицин- HCl — 0,2 М раствор, содержащий 0,15 NaCl , pH 2,4.

Препараты сефарозы с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, иммобилизованной при разной степени активации, помещают в колонки (размер $0,5 \times 3$ см) и уравнивают 0,15 М раствором NaCl . Затем при комнатной температуре через колонки пропускают антисыворотку до полного насыщения иммуносорбента антителами (т. е. до прекращения адсорбции антител на сорбенте при пропускании дополнительных порций антисыворотки). Иммуносорбент отмывают от балластных белков 0,15 М раствором NaCl до исчезновения поглощения при длине волны 280 нм в элюате.

Элюцию антител проводят при 4°C 0,2 М глициновым буфером, pH 2,2. Раствор полученных антител сразу обессоливают на сефадексе

0-50, уравновешенном 0,10 м. наст. На всех стадиях выделения антител определяют содержание белка в препаратах иммуносорбентов для выяснения стехиометрии связывания антител с ферментом и проверки полноты элюции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Незлин Р. С. Биохимия антител. М., 1966.
2. Чередникова Т. В., Муронец В. И., Наградова Н. К. Влияние специфических антител на ассоциацию субъединиц глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы//Биохимия. 1982. Т. 47, № 6. С. 361.

Изучение белков с помощью современных иммунохимических методов способствует выяснению особенностей их организации, механизма функционирования, гомологии с другими белками и т. д. Точность и чувствительность иммунохимических методов анализа, основанных на специфическом связывании антителами определяемого антигена, не имеют себе равных и широко используются в биологических исследованиях. Чувствительность определения составляет до 10^{-12} г/л. При этом нет необходимости иметь очищенные препараты: они могут быть смешаны и находиться в составе сложных многокомпонентных систем.

Особое распространение получили методы, основанные на использовании антигенов и антител, меченных ферментами, — так называемый иммуноферментный анализ. Они используются для изучения широкого круга соединений — антител, пептидных и стероидных гормонов, вирусных и бактериальных антигенов, различных белков и ферментов. Существуют гетерогенные (твердофазные) и гомогенные методы иммуноферментного анализа, принципиально различающиеся способом разделения компонентов иммунохимической реакции. Твердофазные методы основаны на применении антител или антигенов, иммобилизованных на нерастворимых носителях.

В иммуноферментном анализе используются поли- и моноклональные антитела как по отдельности, так и вместе. Относительная легкость получения поликлональных антител из антисывороток иммунизированных животных в ряде случаев дает возможность пренебречь их гетерогенностью. Однако разработка метода получения моноклональных антител — продуктов гибридных клеток — дала им огромные преимущества в иммунохимическом анализе в связи с уникальными свойствами, выгодно отличающими их от антисывороток. Использование моноклональных антител в иммуноферментном анализе дает возможность работать с практически неограниченным источником антител, однородных по молекулярным и иммунологическим свойствам. С их появлением открылись новые возможности для структурного изучения антигенов. Это связано с тем, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами, связываются со специфическим участком на поверхности белковой молекулы — антигенной детерминантой и могут быть использованы в качестве селективных зондов на определенные структурные участки.

Чувствительность в определении единичных аминокислотных замещений в случае моноклональных антител значительно выше по сравнению с антисывороткой и позволяет использовать моноклональные антитела даже для детекции тонких конформационных изменений молекулы белка. Благодаря высокой чувствительности, с которой моноклональные антитела определяют антигенные детерминанты, их можно использовать для точного установления границ и структуры детерминант, а также для идентификации и выделения чистых специфических пептидных фрагментов антигена.

Целью данного раздела является освоение иммунохимических методов и возможностей их использования в изучении антигенных особенностей ферментов.

В разделе изложены методы иммунизации животных и гибридизации клеток для получения поликлональных и моноклональных антител, методы получения препаративных количеств антител и их очистки, способы введения ферментных меток в антитела и антигены для использования в иммуоферментном анализе, способы введения радиоизотопных меток в антитела для радиоиммунного анализа, методы изучения антигенных свойств ферментов

1. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ

1. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Многие растворимые белки, ферменты в том числе, выделенные из различных тканей животных, обладают антигенными свойствами, т.е. при введении в организм вызывают в нем образование антител. Однако их антигенные свойства (иммуногенность) различаются, что проявляется в разной способности стимулировать продукцию антител. В известных пределах иммуногенность коррелирует с молекулярной массой антигена. Иммунохимически чистые антигены применяются обычно в виде 0,01–1,0%-ных растворов, тогда как неочищенные антигены и смеси антигенов приходится вводить в большей концентрации. Слабоиммуногенные антигены необходимо вводить со стимуляторами иммуногенеза, из которых наиболее часто используют адъювант Фрейнда. Антисыворотки против растворимых нативных белков можно получить повторными инъекциями (внутримышечно, подкожно, внутривенно) эмульсии раствора белка с адъювантом или внутривенными инъекциями раствора белка без адъюванта.

Сыворотки со средними титрами антител¹ содержат около 2 мг антител в 1 мл сыворотки.

Получение антисыворотки

Реактивы:

1. Адъювант Фрейнда.
2. Препарат антигена — очищенные иммуноглобулины класса G из сыворотки мыши (IgG).

Иммунизация кроликов. Для иммунизации берут несколько кроликов любого пола в возрасте от полугода до года и выбирают кролика с наивысшими титрами антител.

Схема иммунизации. Для получения антисывороток к мышинным IgG животным внутримышечно (в бедро) и подкожно (в области живота) в нескольких точках вводят 2 мл эмульсии из растворенного в физиологическом растворе IgG (1 мг/мл) и 1 мл адъюванта Фрейнда. Через месяц иммунизацию повторяют, вводя 500 мкг IgG в виде эмульсии с равным объемом адъюванта Фрейнда. Затем каждую вторую неделю в течение 6–8 нед вводят по 200 мкг IgG с адъювантом. Через 2 нед после последней иммунизации из краевой вены уха берут пробы крови и определяют титры антител методом иммуоферментно-

¹ Титр антител — наибольшее разведение иммунной сыворотки, при котором еще наблюдается реакция антител с антигеном.

кровопускание, отделяют сыворотку, определяют титры антител и выделяют IgG. Если нужно взять много крови, выбирают метод повторных пункций сердца. При хорошей экспериментальной технике кролики достаточно хорошо переносят взятие из сердца 40—60 мл крови в неделю.

Выделение IgG

Для выделения γ -глобулинов из сыворотки кролика обычно используют метод трехкратного высаливания сульфатом аммония при конечном насыщении 33%. Соли затем удаляют диализом.

Реактивы:

1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — насыщенный раствор.
2. NaOH — 2 н. раствор.
3. Na-фосфатный буфер — 0,01 М раствор, pH 7,5.
4. Боратный буфер — 0,01 М раствор, pH 8,45.
5. ДЭАЭ-целлюлоза.
6. Антисыворотка кролика к IgG мыши.

К насыщенному раствору $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ добавляют 2 н. NaOH и доводят pH до 7,8. При постоянном перемешивании медленно, по каплям к 50 мл сыворотки кролика добавляют 80 мл насыщенного раствора сульфата аммония (pH 7,8) и перемешивают в течение 2—3 ч. Центрифугируют суспензию при комнатной температуре 30 мин при 1500 g. Первый осадок содержит все γ -глобулины, другие глобулины и следы альбумина. Растворяют осадок в дистиллированной воде до начального объема сыворотки (50 мл). Очищают фракцию γ -глобулинов вторым и третьим осаждениями. После третьего осаждения растворяют осадок в боратном буфере (pH 8,45) до конечного объема 20—25 мл. Удаляют сульфат аммония диализом при 4°C против боратного буфера в течение 2—3 дней со сменой буфера утром и вечером. Полученный после диализа препарат иммуноглобулинов обычно содержит небольшой осадок денатурированного белка и слегка опалесцирует. Центрифугируют при 4°C в течение 30 мин при 1400 g. В полученном препарате проверяют содержание белка и титров антител. Определяют белковый состав методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (с. 119). Если полученный препарат γ -глобулинов не отвечает требованиям эксперимента по чистоте, проводят дальнейшую очистку с применением ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

Если необходимо, концентрируют полученный препарат до конечной концентрации 30—40 мг/мл методом ультрафильтрации или другими альтернативными методами (с. 266). Определяют содержание белка (с. 80).

Берут ДЭАЭ-целлюлозу из расчета 1 г сухого сорбента на каждые 30 мг белка. Обрабатывают ее обычным способом (с. 109) и уравнивают 0,01 М Na-фосфатным буфером, pH 7,5. Стекланную колонку $(1,5\text{--}2)\times 50$ см заполняют целлюлозой $1,5\times 40$ или 2×30 см, уравнивают фосфатным буфером, pH 7,5. Наслаивают не более 8 мл препарата γ -глобулинов, содержащего 200—300 мг белка на колонку $1,5\times 40$ см и не более 10 мл (250—400 мг) на колонку 2×30 см. Элюируют уравнивающим буфером. Собирают фракции (20—30) по

Объединяют первые 5—6 фракций с самым высоким содержанием белка. Концентрируют до 15—20 мг/мл. Определяют содержание белка. Методом электрофореза определяют состав полученного препарата IgG. Диализуют против боратного буфера pH 8,4 в течение ночи при 4°C и хранят при -20°C. Здоровый кролик дает 100—200 мг IgG. Таким же образом можно получить поликлональные антитела к другим белковым антигенам.

2. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

В сыворотке иммунизированных животных всегда накапливаются продукты, секретируемые многими клонами В-лимфоцитов. Сывороточные антитела при любых схемах иммунизации представляют собой смесь молекул антител, гетерогенных по специфичности, аффинности и классовой принадлежности, вследствие чего имеется неизбежная перекрестная реактивность иммунных сывороток с разными антигенами. Перекрестная реактивность делает трудным или невозможным идентификацию уникальных антигенов. Моноклональные антитела, в отличие от поликлональных, являются продуктами потомков всего лишь одной В-клетки, и поэтому препараты моноклональных антител имеют особые свойства, вытекающие из небывалой степени биохимической гомогенности: моноклональные антитела высокоспецифичны. Они направлены против одной и той же антигенной детерминанты; моноклональные антитела стабильны как эталоны в отношении специфичности и аффинности (прочности связи с антигеном). Исследователь может целенаправленно подобрать моноклон, вырабатывающий антитела только нужного «сорта», т. е. класса, подкласса, специфичности, аффинитета.

Иммунизация мышей

Для иммунизации используют мышей — самок инбредной линии BAL B/c в возрасте 8—12 нед.

Реактивы:

1. Адъювант Фрейнда.
2. Препарат белкового антигена.

Растворимые белковые антигены (50—100 мкг), смешанные с равным объемом адъюванта Фрейнда, вводят внутрибрюшинно. Через 2—3 нед проводят повторную иммунизацию без адъюванта. Через 2—4 нед после последней иммунизации берут пробы крови из хвостовой вены мыши. Выбирают мышь с наиболее высоким титром антител в ИФА (с. 321). Проводят гипериммунизацию внутривенно в хвостовую вену (100 мкг) без адъюванта либо внутрибрюшинно в течение трех дней по 30 мкг. Через три дня после внутривенной гипериммунизации мышь забивают цервикальной дислокацией и берут селезенку. При гипериммунизации, проведенной внутрибрюшинно, мышь забивают на следующий день.

Гибридизация клеток

Общая схема получения моноклональных антител представлена на рис. 37.

1. Сыворотка плода коровы.
2. Донорская лошадиная сыворотка.
3. Бикарбонат Na — 7,5%-ный раствор.
4. L-глутамин — 200 мМ раствор.
5. Гентамицин — раствор 50 мг/мл.
6. Пируват Na — 10 мМ раствор.
7. HEPES-буфер — 10%-ный раствор.

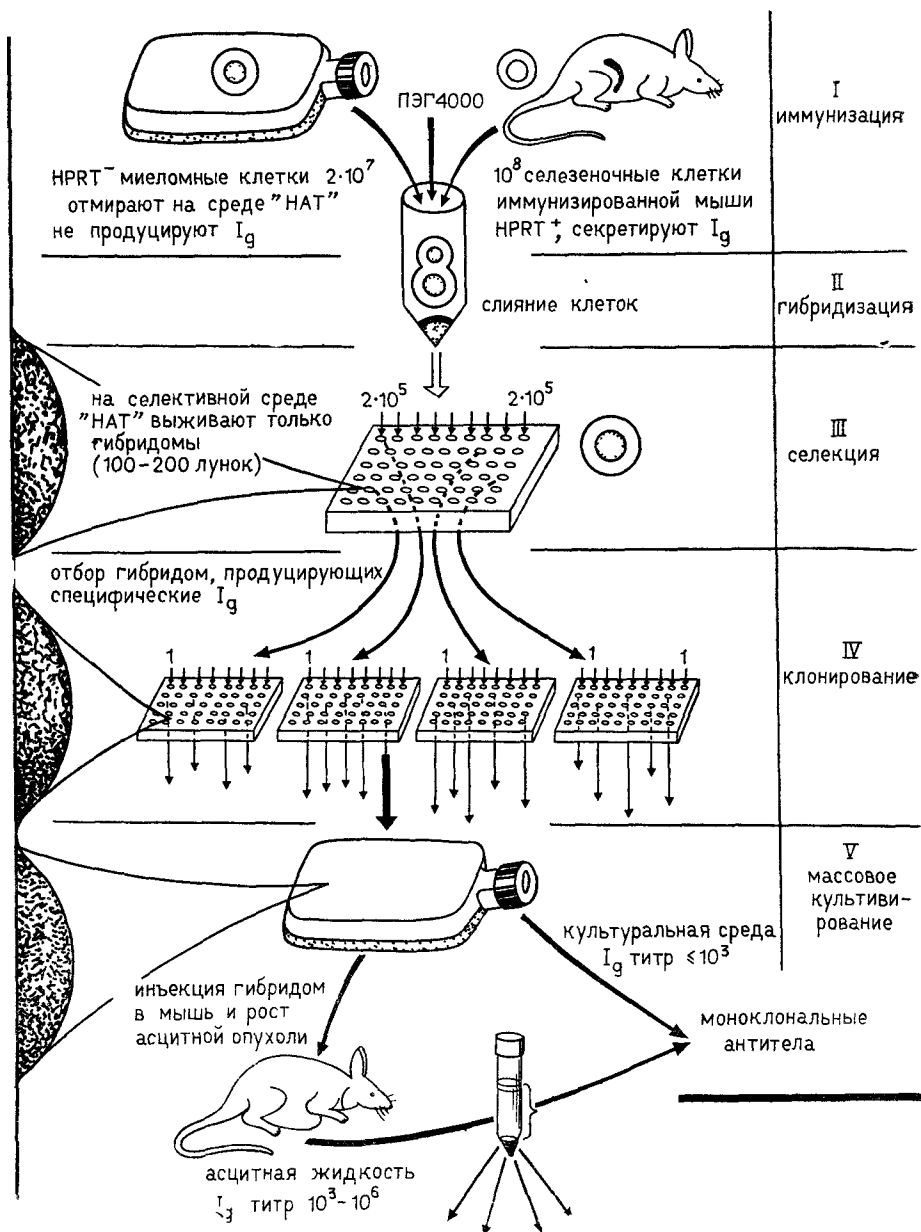


Рис 37. Общая схема получения моноклональных антител в ИФА

8. HCl — 1 н. раствор.
9. NaOH — 5 н. раствор.
10. Трипановый синий — 0,5%-ный раствор.
11. Среда Игла в модификации Дульбекко (СИМД).
12. Гипоксантин.
13. Аминоптерин.
14. Тимидин.
15. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) — м. м. 4000 Да.
16. Диметилсульфоксид (ДМСО).

Партнерами для гибридизации являются клетки селезенки предварительно иммунизированной мыши и клетки культивируемой мышиной миеломной линии Sp₂/O—Ag14 или X63-Ag8.6.5.3., резистентные к 8-азагуанину.

Миеломные культуры. Клетки выращивают в среде Игла в модификации Дульбекко (СИМД) с добавлением 10% плодной сыворотки коровы, 10% донорской лошадиной сыворотки, 5% бикарбоната Na, 2% L-глутамина, 0,1% гентамицина и 1% пирувата Na. Доводят pH среды до 7,2–7,4 (по индикатору феноловому красному) 5н. раствором NaOH.

Плотность клеточной суспензии составляет $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Клетки поддерживают в логарифмической стадии роста.

Приготовление суспензии миеломных клеток для гибридизации. Работа с клетками и культуральными средами должна проводиться в условиях, абсолютно стерильных! 50 мл среды с культивируемыми миеломными клетками, находящимися в логарифмической стадии роста, центрифугируют в течение 8 мин при 800 об/мин, надосадок сливают в отдельную пробирку. Клетки суспендируют в 50 мл холодной ростовой среды без сыворотки (бессывороточная среда), отмывают центрифугированием при тех же условиях и суспендируют в 20 мл холодной бессывороточной среды. Клетки подсчитывают в камере Горяева. Их количество должно быть не менее 10^7 .

Кондиционированная среда (КС) — среда, в которой выращивались миеломные клетки в логарифмической стадии роста. Клетки удаляют центрифугированием в течение 8 мин при 800 об/мин.

Гибридомная среда (ГС). Среда для культивирования гибридных клеток (гибридом) готовят из равных объемов ростовой и кондиционированной среды.

Приготовление селективных сред. Предварительно готовят растворы А и ГТ.

Раствор А: 1,76 мг аминоптерина растворяют в 90 мл дистиллированной воды с 0,5 мл 1 н. NaOH. После доведения объема до 100 мл раствор нейтрализуют 0,5 н. HCl. Предохраняют от света.

Раствор ГТ: 136,1 мг гипоксантина и 37,8 мг тимидина растворяют в 100 мл дистиллированной воды при 45–50 °С.

Растворы А и ГТ стерилизуют фильтрованием (размер пор — 0,22 мкм) и хранят в замороженном виде при –20 °С.

Селективную среду ГАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин) готовят на основе ГС с добавлением 5 мл растворов А и ГТ к 500 мл исходной среды. Селективную среду ГТ (гипоксантин, тимидин) готовят на основе ГС с добавлением 5 мл раствора ГТ к 500 мл исходной среды.

Приготовление 50%-ного раствора ПЭГ. В ПЭГ, стерилизованный автоклавированием, добавляют 0,8 мл ростовой среды без сыворотки,

нагревают до полного растворения NH_4Cl , охлаждают до 40°C , добавляют 0,1 мл диметилсульфоксида и используют для гибридизации.

Приготовление суспензии клеток селезенки. Извлеченную асептически селезенку помещают в чашку Петри с 5 мл ростовой среды без сыворотки, отмывают, надрезают стерильно капсулу и помещают в стеклянный гомогенизатор с неплотно прилегающим стеклянным пестиком. Очень осторожно выдавливают из капсулы клетки в бессывороточной среде, оставляют на 5 мин для осаждения крупных частиц и переливают в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Доводят объем до 30 мл добавлением холодной бессывороточной среды и отмывают клетки центрифугированием в течение 8 мин при 800 об/мин. Для удаления из суспензии клеток эритроцитов осадок суспендируют в 15 мл 0,83%-ного раствора NH_4Cl на льду, через 5 мин инкубации осторожно подсливают 10 мл любой сыворотки и центрифугируют в течение 8 мин при 800 об/мин. Тени лизированных в NH_4Cl эритроцитов остаются в надосадке, который отбрасывается. Осадок чистых спленоцитов суспендируют в 20 мл холодной бессывороточной среды и подсчитывают жизнеспособные клетки в камере Горяева в смеси 20 мкл клеточной суспензии с 1 мл 0,1%-ного раствора трипанового синего. Жизнеспособные клетки (остаются неокрашенными) должны составлять не менее 80%.

Слияние клеток. Смешивают суспензии клеток миеломы и селезенки в соотношении 1:10 и центрифугируют в течение 8 мин при 800 об/мин. Супернатант полностью сливают. Осадок встряхивают и по каплям добавляют 1 мл 50%-ного раствора ПЭГ с ДМСО в течение 1 мин при постоянном встряхивании пробирки. Клетки центрифугируют в следующем режиме: разгоняют центрифугу до 1000 об/мин и тут же выключают. После остановки центрифуги вынимают пробирку с осевшими клетками и суспендируют клетки встряхиванием в том же растворе ПЭГ. К суспензии клеток добавляют по каплям 1 мл бессывороточной среды в течение 1 мин, затем каждую последующую минуту удваивают объем, добавляя 2, 4, 8 и 16 мл соответственно при постоянном встряхивании пробирки до конечного объема 32 мл. Клетки центрифугируют в обычном режиме в течение 8 мин при 800 об/мин. Супернатант отбрасывают, клетки суспендируют в селективной среде ГАТ в концентрации 10^5 – $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл. Полученную суспензию клеток распределяют в 96-луночные микропланшеты по 200 мкл в лунку (5–10 микропланшетов). Микропланшеты помещают во влажный CO_2 -инкубатор с 5% CO_2 .

Через 10–14 дней проверяют микропланшеты на появление клонов гибридом и заменяют среду ГАТ на среду ГТ, которую заменяют на свежую каждые 3 дня до тех пор, пока выросшие клетки не займут 1/4 площади лунок. Затем переходят на ГС, которую также заменяют на свежую каждые 2–3 дня. Когда клетки займут 1/3 площади лунок, гибридомы тестируют на специфичность методом ИФА (с. 320). Специфичные гибридомы реклонировуют в полужидком агаре и далее — методом предельных разведений.

Клонирование гибридом в полужидком агаре

Накануне берут асептически селезенку неиммунизированной мыши и выделяют спленоциты (см. выше). После удаления эритроцитов клетки отмывают центрифугированием и суспендируют в ростовой среде. Суспензию спленоцитов разливают по 5 мл в чашки Петри из

расчета одна гибридома на 2 чашки. Чашки Петри с клетками селезенки помещают в CO_2 -инкубатор с 5% CO_2 .

Готовят 2%-ный раствор агара в бессывороточной среде (СИМД), разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют автоклавированием. Хранят при 4°C.

Берут суспензии гибридомных клеток, отмывают центрифугированием при обычных условиях и подсчитывают в камере Горяева. Готовят две клеточные суспензии для каждой гибридомы: $2,5 \cdot 10^3$ клеток в 1 мл и $1,25 \cdot 10^3$ клеток в 1 мл. Суспензии готовят в холодной гибридомной среде с 20% сыворотки плода коровы. Объем суспензии — по 2 мл.

Расплавляют агар в водяной бане при 100°C, охлаждают до 40°C и смешивают с равным объемом ростовой среды с 20% сыворотки плода коровы при 40°C (все делают быстро во избежание застывания агара). Из чашек Петри с фидерными клетками пастеровской пипеткой полностью отбирают среду, в чашки заливают агар и оставляют до застывания агара. К подготовленным клеточным суспензиям добавляют по 4 мл агара и разливают в чашки Петри с предварительно застывшим агаром. Для каждой гибридомы получают по две чашки Петри с концентрацией клеток, различающейся в два раза. Чашки ставят во влажный CO_2 -инкубатор с 5% CO_2 при 37°C. В течение 1—2 нед в чашках Петри появляются колонии клеток, видимые невооруженным глазом как белые пятнышки. С помощью пастеровской пипетки отдельные клоны гибридом переносят в 96-луночные планшеты с фидерными селезеночными клетками в ростовой среде (200 мкл в лунку).

После того как клоны займут около 1/4 лунки, культуральные жидкости тестируют на присутствие специфических антител методом ИФА (с. 320). Позитивные клоны реклонировуют методом предельных разведений.

Клонирование гибридом методом лимитирующего разведения

Реактивы:

1. Гибридомная среда (ГС).
2. Сыворотка плода коровы.

Накануне готовят 96-луночные микропланшеты с питающими клетками из расчета одна гибридома на один микропланшет. Микропланшеты ставят во влажный CO_2 -инкубатор с 5% CO_2 при 37°C. На следующий день готовят две суспензии гибридомных клеток в холодной среде из расчета 1 клетка в 100 мкл и 0,5 клетки в 100 мкл. Каждый 96-луночный планшет делят на две части и в каждые 48 лунок распределяют одну и другую клеточные суспензии одного клона гибридомы. Помещают микропланшеты в CO_2 -инкубатор. Через 10—14 дней проверяют рост колоний в микропланшетах и отбирают те, в которых колонии выросли в менее 30% лунок. Культуральные жидкости из этих лунок тестируют методом ИФА (с. 320) на присутствие специфических антител. Клетки из лунок, давших положительные реакции, последовательно наращивают в 96-, 24-луночных чашках и культуральных матрасах. Часть выросших клеток замораживают для сохранения и дальнейшего использования

Замораживание и оттаивание клеток

Реактивы:

1. Диметилсульфоксид (ДМСО).
2. Ростовая среда.
3. Сыворотка плода коровы.
4. Трипановый синий — 1%-ный раствор в фосфатном буфере.

Накануне замораживания заменяют среду, в которой культивируются гибридомы, на свежую. Клетки замораживают только в экспоненциальной стадии роста.

Среду для замораживания клеток получают смешиванием при 4°C 50% ростовой среды, 10% ДМСО и 40% сыворотки. Берут 50 мл суспензии клеток, осаждают их центрифугированием, удаляют супернатант. Клетки ($5 \cdot 10^6$ — 10^7) суспендируют в 1 мл среды для замораживания и переносят в специальные ампулы. Их выдерживают в течение часа при 4°C, затем помещают в коробку из пенопласта и переносят в холодильник на -70°C , где выдерживают в течение ночи. На следующий день ампулы с клетками помещают в жидкий азот.

Для размораживания клеток ампулы извлекают из жидкого азота, помещают в водяную баню при 37°C. После полного размораживания клетки стерильно переносят в пробирки и отмывают центрифугированием в 50 мл ростовой среды. Супернатант удаляют, клетки суспендируют в свежей порции ростовой среды (15—25 мл) и помещают в культуральный матрас. На следующий день 100 мкл суспензии клеток смешивают со 100 мкл трипанового синего и подсчитывают живые клетки в камере Горяева (трипановый синий окрашивает только поврежденные клетки). Жизнеспособность размороженных клеток обычно составляет не менее 80%.

Получение препаративных количеств моноклональных антител

Реактивы:

1. Ростовая среда (СИМД).
2. Бессывороточная среда (СИМД).
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — насыщенный раствор.
4. NaOH — 2 н. раствор.
5. Пристан — (2, 6, 10, 14-тетраметилпентадекан).
6. NH_4Cl — 0,83%-ный раствор в трис- HCl буфере, pH 9,2.
7. Эфир.
8. Этанол — 70%-ный раствор в воде.

Наработка в культуре. Клетки гибридомы культивируют в течение 4—5 дней без смены среды. Клетки осаждают центрифугированием. Надосадок, содержащий моноклональные антитела, собирают и используют для их получения. Клетки суспендируют в свежей ростовой среде и культивируют таким же способом. Концентрируют полученную культуральную жидкость $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (с. 308) и хранят при 4°C до использования.

Наработка в асцитных опухолях мышей. За 10 дней до введения клеток мышам сингенной линии BALB/c вводят внутривенно 0,1 мл пристана². Клетки в количестве $5 \cdot 10^6$ — 10^7 , суспендированные

² Можно заменить вазелиновым маслом.

в 0,5 мл бессывороточной среды, вводят внутривентально. В течение 12—16 дней следят за образованием асцитной опухоли. Мышь с хорошо развитой асцитной опухолью эфирно анестезируют, моют в 70%-ном этаноле и фиксируют на препаровальном столике. С помощью стерильных инструментов (ножницы, пинцет) обнажают брюшину и вводят иглу шприца на 5 мл для забора асцитной жидкости. Переносят асцитную жидкость в пробирку и осаждают клетки центрифугированием. Асцитную жидкость стерильно переносят в другую пробирку и хранят при 4°C до использования. Клетки гибридом освобождают от эритроцитов, лизируя их в NH_4Cl , подсчитывают и вводят мышам.

Методом ИФА (с. 320) определяют титры антител в асцитной жидкости. Затем ее концентрируют $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и хранят при 4°C до использования.

Очистка моноклональных антител

Очистка на белок А-сефарозе

Реактивы:

1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — насыщенный раствор.
2. NaOH — 2 н. раствор.
3. Фосфатные буферы: А — 0,5 М раствор, pH 8,0;
Б — 0,1 М раствор, pH 8,0;
В — 0,01 М раствор, содержащий 0,15 М NaCl , pH 7,2.
4. Цитратные буферы — 0,1 М растворы: а) pH 6,0; б) pH 4,5; в) pH 3.

К 20 мл асцитной или культуральной жидкости при постоянном перемешивании добавляют по каплям 20 мл насыщенного раствора сульфата аммония, pH 6,5. Смесь оставляют на 1 ч при 4°C и затем центрифугируют. Супернатант отбрасывают, осадок растворяют в дистиллированной воде в 1/20 начального объема (1 мл) и диализуют против текущей воды в течение 3 ч, затем — против двух смен фосфатного буфера, pH 8,0.

1,5 г белок А-сефарозы суспендируют в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5,0 ($V \approx 5$ мл), и заполняют пипетку на 10 мл, взятую в качестве колонки. Препарат отдиализованных антител наносят на колонку и промывают ее 25 мл уравнивающего буфера. В случае, если антитела принадлежат к подклассу *IgG1*, их элюцию проводят цитратным буфером, pH 6,0. Антитела подклассов *IgG2a* и *IgG3* элюируют цитратным буфером, pH 4,5. *IgG2b* элюируют цитратным буфером, pH 3,0. В двух последних случаях фракции собирают в пробирки, содержащие 200—400 мкл 0,5 М фосфатного буфера (pH 8,0) для быстрой нейтрализации цитратного буфера. После каждого опыта колонку промывают фосфатным буфером и хранят при 4°C. Связывающая емкость белок А-сефарозы составляет около 20 мг *IgG* на 1 мл геля.

Полученные препараты антител диализуют против фосфатного буфера, pH 7,2. Определяют белок по методу Лоури (с. 81) и, если нужно, концентрируют препарат антител (с. 266) до 2—5 мг/мл и хранят при 4°C с добавлением 0,01% NaN_3 .

Очистка на ДЭАЭ-целлюлозе

Для очистки больших количеств моноклональных антител из асцитных жидкостей применяют хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе.

Реактивы:

1. Асцитная жидкость.
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — насыщенный раствор.
3. NaOH — 2 н. раствор.
4. Трис- HCl буферы, pH 7,8: А — 20 mM раствор; Б — 20 mM раствор, 20 mM NaCl ; В — 20 mM раствор, 40 mM NaCl ; Г — 20 mM раствор, 400 mM NaCl .

Асцитные жидкости центрифугируют при 50 000 *g* в течение 30 мин. Супернатант разбавляют в четыре раза холодным фосфатным буфером. Добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония при постоянном перемешивании и оставляют на 1 ч при 4°C. Центрифугируют при 5000 *g* в течение 10 мин. Осадок растворяют в буфере В и диализуют против буфера Б. Меняют буфер через 3–4 ч. Диализуют не менее 8 ч. Центрифугируют при 15 000 *g* в течение 10 мин для удаления денатурированных белков. Измеряют экстинкцию при 280 нм предварительно разбавленного в 100 раз раствора и по формуле ($A_{280}:1,25$) рассчитывают содержание белка в миллиграммах (асцитные жидкости содержат обычно 25–35 мг/мл белка).

ДЭАЭ-целлюлозу, обработанную как обычно (с. 109), уравнивают буфером Б. Объем сорбента выбирают из расчета 5–7 мг белка на 1 мл сорбента. Хроматографию проводят при комнатной температуре. Диализованный препарат антител разбавляют равным объемом буфера А и наносят на колонку со скоростью 1–2 мл/мин. Промывают буфером Б в объеме, равном 1/10 объема колонки. Элюируют линейным градиентом NaCl , создаваемым буферами Б и Г. Полный объем градиента равен 5–7 объемам колонки, время 20–22 ч. Каждые 10 мин собирают фракции. Большинство моноклональных антител элюируются между 40 и 80 mM NaCl , остальные антитела — между 120–150 mM NaCl . Фракции, соответствующие белковому пику, измеряют при 280 нм, добавляют NaCl до конечной концентрации 0,15 М. Очищенные *IgG* имеют чистоту 90% и содержат 1–2 мг *IgG* в 1 мл. Обычно выход *IgG* составляет от 1 до 6 мг из 1 мл асцитной жидкости.

Очистка иммуноглобулинов класса М (*IgM*)

Реактивы:

1. Сефадекс G-200.
2. Трис- HCl буфер — 0,1 М раствор, содержащий 0,5 М NaCl , pH 7,8.
3. Препарат антител.

IgM очищают гель-фильтрацией на сефадексе G-200. Колонку готовят, как обычно (с. 107), размер колонки 2,5×90 см, скорость тока 12–15 мл/ч.

II. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛ С ФЕРМЕНТНЫМИ МЕТКАМИ

Ферменты, используемые в ИФА в качестве маркеров, должны отвечать ряду требований: иметь высокую активность и стабильность в условиях анализа; чувствительный и простой метод определения продуктов или субстратов ферментативной реакции; сохранять активность и стабильность после конъюгирования с антителами; быть доступным при высокой степени чистоты. Непременным условием является отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемых биологических жидкостях. Всем этим требованиям отвечают наиболее часто применяемые в ИФА пероксидаза и щелочная фосфатаза.

Наибольшее распространение получили методы введения ферментной метки, основанные на образовании ковалентной связи между молекулами антитела и фермента. Наибольшее практическое применение нашел метод получения иммунопероксидазных конъюгатов окислением углеводного компонента фермента периодатом натрия. В случае использования щелочной фосфатазы в качестве фермента-маркера применяют глутаровый альдегид, взаимодействующий с ϵ -аминогруппами белковых молекул.

1. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛ С ПЕРОКСИДАЗОЙ

Реактивы:

1. Пероксидаза из хрена (R_z -3).
2. NaIO_4 — 0,2 М раствор.
3. АБТС — 2,2'-азиноди-(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)- 2NH_4 — 40 мМ раствор в воде.
4. H_2O_2 — концентрированная (30%).
5. Твин-20.
6. Глицерин.
7. Ацетатный буфер — 0,001 М раствор, pH 4,4.
8. Фосфатный буфер — 0,01 М раствор, pH 7,2–7,4.
9. Бикарбонатный буфер — 0,2 М раствор, pH 9,5.
10. Цитратный буфер — 0,01 М раствор, pH 4,0.
11. Этиленгликоль — 0,64 М раствор.
12. NaBH_4 .

Окисление пероксидазы. Растворяют 5–10 мг пероксидазы в 1 мл дистиллированной воды при легком перемешивании до конечной концентрации 5 мг/мл. Концентрацию определяют по формуле $A_{403} \cdot 0,44X$, где X — фактор разведения, A_{403} — оптическая плотность раствора при 403 нм. К раствору фермента добавляют 0,2 М водный раствор NaIO_4 до конечной концентрации 0,016 М. При этом раствор пероксидазы должен изменить цвет от золотисто-коричневого до зеленого. Инкубируют в темноте при легком перемешивании в течение 20 мин. Процесс окисления останавливают добавлением этиленгликоля до конечной концентрации 0,16 М. Смесь инкубируют при тех же условиях в течение 1 ч и диализуют против 1000-кратного объема ацетатного буфера при 4 °С в течение 18–24 ч.

Связывание модифицированной пероксидазы с антителами. Определяют концентрацию антител в растворе по формуле $A_{280}(X:1,3)$, где X — коэффициент разбавления. Оптимальное соотношение количе-

ства иммуноглобулинов к количеству пероксидазы составляет 2:1. Прогревают раствор антител при 56°C в течение 30 мин (в случае поликлональных антител). Доводят pH раствора антител и модифицированной пероксидазы до 9,5 бикарбонатным буфером. Растворы немедленно объединяют, внося раствор иммуноглобулинов по каплям, и инкубируют смесь при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч при непрерывном легком перемешивании. Добавляют NaBH_4 из расчета 1 мг NaBH_4 на 1 мг пероксидазы и инкубируют еще 2 ч при той же температуре. Диализуют против 1000-кратного объема 0,01 М фосфатного буфера. Диализ можно заменить гель-фильтрацией на сефадексе G-25 или G-50 (с. 106). Фракции, содержащие конъюгат, окрашены в светло-коричневый цвет, вследствие чего могут быть собраны без использования какого-либо регистрирующего прибора, чисто визуально. В полученный конъюгат добавляют 50% глицерина и хранят при -20°C.

2. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛ С ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗОЙ

Реактивы:

1. Щелочная фосфатаза — препарат в сульфате аммония.
2. Фосфатные буферы — 0,05 и 0,15 М растворы, pH 7,2.
3. Глутаральдегид — 25%-ный раствор.
4. Трис-буфер — 0,05 М раствор, содержащий 0,001 М MgCl_2 , 5 % БСА, pH 8.

Берут 1,5 мг препарата щелочной фосфатазы и центрифугируют при 4500 g в течение 20 мин при 4°C. Осторожно удаляют супернатант и к осадку добавляют 0,5 мг очищенных иммуноглобулинов в концентрации 2,5 мг/мл в фосфатном буфере. Объем смеси доводят до 0,2 мл 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,2. Раствор диализуют против фосфатного буфера 0,15 М (pH 7,2) в течение ночи, доводят объем до 0,5 мл и добавляют раствор глутаральдегида до конечной концентрации 0,2%, инкубируют при комнатной температуре в течение 2 ч при осторожном перемешивании. Доводят объем до 2 мл 0,15 М фосфатным буфером и диализуют против того же буфера в течение ночи при 4°C. Затем раствор доводят до 10 мл трис-буфером и хранят при 4°C.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАБОЧЕГО ТИТРА КОНЪЮГАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С ФЕРМЕНТНОЙ МЕТКОЙ

Реактивы:

1. Раствор антител.
2. Все реактивы для проведения ИФА (см. с. 320).
3. 5'-аминосалициловая кислота.
4. NaOH — 1 н. раствор.
5. o-фенилендиамин.
6. Фосфат-цитратный буфер — 0,2 М раствор Na_2HPO_4 , 0,1 М раствор лимонной кислоты.
7. АБТС.
8. 4-нитрофенилфосфат.
9. Диэтаноламин.
10. HCl — 1 н. раствор.
11. H_2O_2 — концентрированный раствор.
12. Конъюгаты антител с ферментной меткой.

Рабочие титры антител определяют в реакции ИФА методом «шахматного титрования» с использованием «сэндвич»-метода ИФА. Суть метода заключается в использовании «подложки», т. е. слоя неспецифически сорбированных иммуноглобулинов, с которыми затем взаимодействует специфический антиген. Этот антиген в дальнейшем выявляется с помощью конъюгатов антител с ферментной меткой. Схема «сэндвич»-метода представлена на рис. 38. 96-луночный микропланшет заполняют раствором антител в концентрации 10 мкг/мл по 100 мкл в лунку и оставляют на ночь при 4°C. На следующий день после 3-кратного отмывания фосфатным буфером с твином-20 (с. 321) титруют положительный антиген по короткому ряду микропланшета, так же титруют отрицательный антиген³. После инкубации в течение 1 ч при 37°C и последующего 3-кратного отмывания в таких же условиях титруют конъюгат антител в буфере по длинному ряду микропланшета. Инкубируют в течение часа. После исчерпывающего отмывания вносят субстратную смесь.

Приготовление субстратных смесей.

Для пероксидазы. 1) 5'-аминосалициловая кислота: 8 мг 5'-аминосалициловой кислоты растворяют в 10 мл нагретой до кипения дистиллированной воды, к раствору после остывания добавляют 20 мкл 1 н. NaOH и 1 мкл 30%-ной H₂O₂;

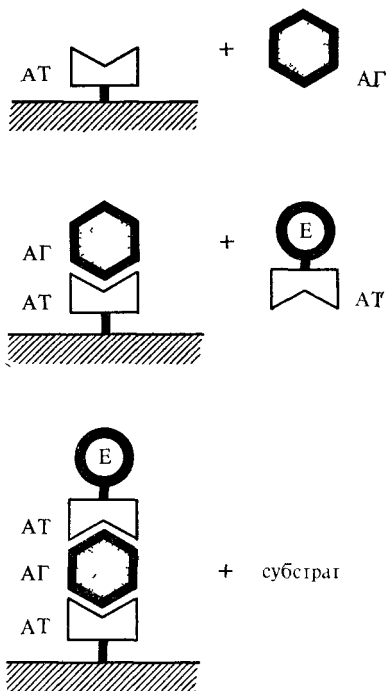


Рис. 38. Схема «сэндвич»-метода определения антигена в ИФА.

АТ — иммобилизованные антитела; АГ — определяемый антиген; АТ—Е — конъюгат антител с ферментной меткой

2) о-фенилендиамин: 20 мг субстрата растворяют в 10 мл фосфат-цитратного буфера (приготовление буфера: к 25,7 мл 0,2 М раствора Na₂HPO₄ добавить 24,3 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты, 50 мл дистиллированной воды и затем 5 мкл 30%-ной H₂O₂); 3) АБТС: 22,6 мг субстрата растворяют в 1 мл воды, 0,1 мл полученного раствора добавляют к 10 мл цитратного буфера — 0,01 М раствор, pH 4,0 вносят 5 мкл 30%-ной H₂O₂.

Для щелочной фосфатазы: 4-нитрофенилфосфат: 10 мг субстрата растворяют в 10 мл буфера, который готовят следующим образом: 97 мл диэтанолamina смешивают с 800 мл воды, добавляют 0,2 г NaN₃, 0,1 г MgCl₂·6H₂O и доводят pH до 9,8 с помощью 1 н. раствора HCl; общий объем доводят до 1 л и хранят в темноте при комнатной температуре.

В случае, когда субстратом служит АБТС, реакцию останавливают через 30 мин добавлением 50 мкл 10%-ного раствора ДСН, определяют оптическую плотность при 452 мкм на специальном спектрофотометре с вертикальным лучом «Flow Lab». При использовании дру-

³ Любой белок, не дающий перекрестных реакций с антителами.

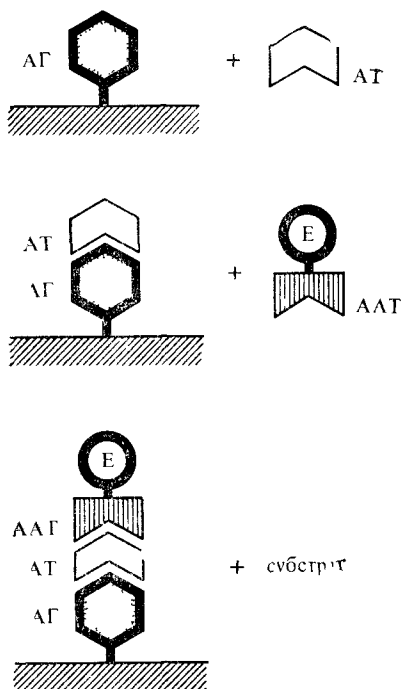
гих субстратов оптическую плотность⁴ определяют при соответствующей длине волны⁴, которую выбирают в зависимости от окраски продуктов реакции.

Рабочим титром конъюгата считается такое его разведение, которое в случае АБТС дает ярко-зеленое окрашивание с положительным антигеном, тогда как с отрицательным антигеном окрашивание должно быть сопоставимо с окраской субстратной смеси. При этом должно выявляться минимальное количество положительного антигена. При спектрофотометрическом анализе рабочим титром конъюгата будет разведение, дающее в положительном контроле 1,5—1,2 опт. ед., а в отрицательном — не более 0,05 опт. ед. Если в положительном контроле значение оптической плотности будет ниже 1,2 опт. ед., использование такого конъюгата в работе нежелательно.

III. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ АНТИТЕЛ

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ГИБРИДОМ

Для определения специфичности гибридом используют, как правило, непрямой метод ИФА с использованием антивидовых антител, конъюгированных с ферментной меткой. В нашем случае используются конъюгаты кроличьих антимышиных антител с пероксидазой, приготовленные, как описано выше (см. с. 317). Общая схема непрямого метода ИФА представлена на рис. 39.



Реактивы:

1. Конъюгат антимышиных антител с пероксидазой.
2. АБТС.
3. H_2O_2 — 30%-ный раствор.
4. Твин-20.
5. Цитратный буфер — 0,01 М раствор, pH 4,0.
6. Фосфатный буфер — 0,01 М раствор, pH 7,4.
7. Бычий сывороточный альбумин (БСА) — 1%-ный раствор.

Рис. 39. Схема «непрямого» метода определения антител в ИФА.

АГ — иммобилизованный антиген; АТ — определяемые антитела; ААТ—Е — конъюгат антивидовых антител с ферментной меткой

Берут 96-луночные микропланшеты для иммуноферментного анализа (ИФА) с плоским дном. Количество микропланшетов определяется числом исследуемых клонов гибридом. Раствор антигена в концентрации 1 мг/мл вносят в лунки микропланшетов в объеме 50 мкл

⁴ Оптическая плотность для 5'-аминосалициловой кислоты измеряется при 450 нм, для о-фенилендиамина — при 492 нм, для 4-нитрофенилфосфата — при 405 нм.

и инкубируют: а) в течение ночи при 4°C; б) в течение 1 ч при 37°C. Затем микропланшеты интенсивно (не менее 3 раз) отмывают фосфатным буфером, содержащим 0,05% твина-20. Блокирование неспецифических мест связывания проводят 1%-ным раствором БСА по 100 мкл в лунку и инкубируют в течение 1 ч при 37°C. БСА интенсивно отмывают фосфатным буфером с твином-20 и в лунки вносят по 50 мкл культуральной жидкости. Микропланшеты инкубируют одним из выше перечисленных способов, затем тщательно отмывают и вносят по 50 мкл конъюгата кроличьих антител. После инкубации в течение часа при 37°C несвязавшиеся кроличьи антитела отмывают и вносят субстрат АБТС. Реакцию останавливают через 30 мин добавлением 50 мкл 1 н. H_2SO_4 и определяют величину оптического поглощения на специальном спектрофотометре «Flow Lab» при 452 нм. В качестве положительного контроля используют сыворотку мышей, которые были иммунизированы данным антигеном и селезенки которых использовали для сливания. В качестве отрицательного контроля берут культуральную среду из лунок, не давших рост клонов, или ростовую среду.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРОВ АНТИТЕЛ В АСЦИТНЫХ ЖИДКОСТЯХ

Асцитную жидкость титруют с предварительно сорбированным антигеном, как указано выше. Титрование проводят по двум длинным рядам 96-луночного микропланшета для ИФА с плоским дном. Начальное разведение асцитной жидкости в фосфатном буфере выбирают равным 1:100 (50 мкл в лунку). Инкубируют при 37°C в течение часа. Микропланшет тщательно отмывают (не менее 3 раз) фосфатным буфером с 0,05% твина-20. В лунки вносят по 50 мкл раствора конъюгата антимышиных антител с пероксидазой в фосфатном буфере с 1%-ным раствором БСА и снова инкубируют в течение 1 ч при 37°C. После тщательной отмывки вносят свежеприготовленный раствор субстрата пероксидазы АБТС (с. 319). Реакцию останавливают через 30 мин добавлением 50 мкл 1 н. H_2SO_4 и определяют оптическую плотность, которая должна быть пропорциональна содержанию антител в данной лунке. Строят график зависимости оптического поглощения при 452 нм от степени разведения асцитной жидкости (рис. 40). Из полученного графика определяют титр антител в данной асцитной жидкости.

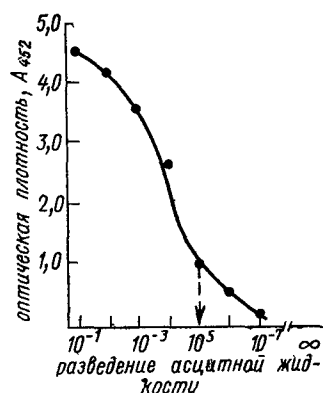


Рис. 40. Определение титров антител в асците.

Титр антител в асците равен 10^{-5}

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАССОВ И ПОДКЛАССОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Реактивы:

1. Конъюгаты антимышиных IgG к тяжелым цепям иммуноглобулинов мыши: $\gamma_1\gamma_2\alpha\gamma_2\beta\gamma_3\mu$ с пероксидазой.
2. Все реактивы для ИФА (см. с. 320).

Определение классов и подклассов антител важно для выбора способа их очистки. Классы и подклассы моноклональных иммуноглобулинов, секретируемых специфическими гибридами, определяют прямым методом ИФА (рис. 41).

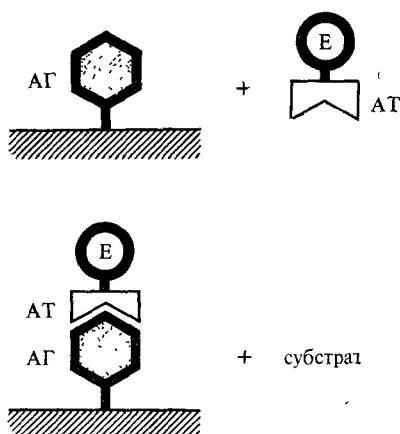


рис. 41. Схема «прямого» метода определения антигена в ИФА.
АГ — иммобилизованный антиген;
АТ-Е — конъюгат антител с ферментной меткой

гаты антимышиных *IgG* к различным подклассам иммуноглобулинов с пероксидазой.

Берут 96-луночные микропланшеты из расчета по 2 лунки на одну гибридому, вносят в каждую лунку по 50 мкл культуральной жидкости специфических гибридом и инкубируют в течение ночи при 4°С. Затем тщательно отмывают фосфатным буфером с 0,05% твина-20. В каждую лунку вносят по 50 мкл раствора конъюгата антимышиных *IgG* к *IgG* и *IgM* с пероксидазой в фосфатном буфере с 1% БСА. Инкубируют 2 ч при комнатной температуре. Микропланшеты тщательно отмывают и в лунки вносят субстратную смесь (с. 319). Реакцию останавливают через 30 мин, внося в лунки 50 мкл 10%-ного раствора ДСН. Полученные результаты учитывают на спектрофотометре при 452 нм. В культуральных жидкостях, содержащих моноклональные иммуноглобулины класса *G*, определяют подклассы *IgG* точно так же, используя конъю-

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭПИТОПНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИТЕЛ

Реактивы:

1. Раствор антигена 1 мг/мл.
2. Моноклональные антитела к антигену (не менее 50 мкг/мл в 1% БСА).
3. Конъюгаты моноклональных антител с пероксидазой.
4. Все реактивы для ИФА (с. 320).

Для использования моноклональных антител в изучении белковых антигенов важно знать, с одной и той же или разными антигенными детерминантами (эпитопами) антигена связываются полученные антитела. Эпитопную специфичность антител определяют методом их конкурентного связывания. Антитела одного клона конъюгируют с пероксидазой (с. 317). Берут 96-луночный микропланшет для ИФА и сорбируют в лунках антиген, как обычно (с. 320). После тщательной отмывки в каждую из 12 лунок вносят по 75 мкл культуральной жидкости того же или других клонов или растворов очищенных антител — 100 мкг/мл (рис. 42). Все остальные лунки содержат 50 мкл фосфатного буфера с 1%-ным БСА. Делают серийные разведения антител, перенося по 25 мкл раствора из каждой лунки в соседнюю (рис. 42) на 5–6 лунок. К каждой лунке добавляют 10 мкл меченных пероксидазой антител в концентрацию 20 мкг/мл. Инкубируют 2–4 ч при комнатной температуре при постоянном встряхивании. После тщательной

отмывки добавляют субстратную смесь (с. 319). Реакцию останавливают через 30 мин добавлением 50 мкл 10%-ного ДСН и определяют оптическую плотность при 452 нм. Строят графики зависимости оптической плотности от концентрации антител. Если антитела направле-

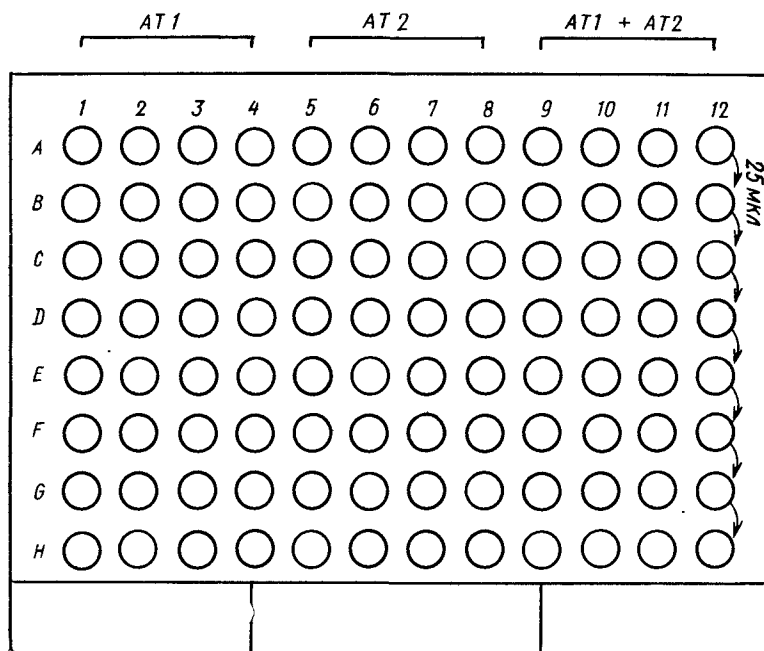
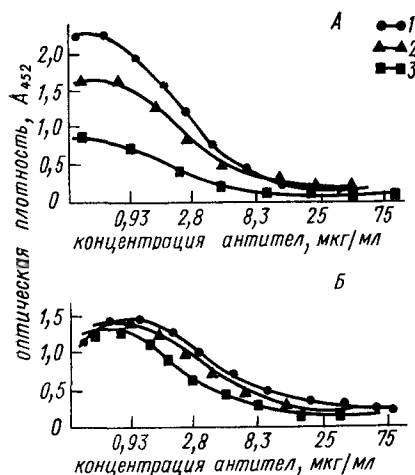


Рис. 42. Схема раститровки антител для определения эпитопной специфичности антител



ны к одной и той же антигенной детерминанте, будет получен график, представленный на рис. 43, Б. Если же антитела направлены к разным антигенным детерминантам, полученная зависимость будет аналогична представленной на рис. 43, А.

Рис. 43. Конкуренция между антителами при связывании с антигеном, сорбированным на микропланшете: 1—АТ 1, 2—АТ 2, 3—АТ 1+АТ 2.

А — антитела не конкурируют за связывание, направлены к разным детерминантам; Б — антитела конкурируют за связывание, направлены к одной и той же детерминанте

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФФИННОСТИ АНТИТЕЛ

Аффинность моноклональных антител к антигену является важным параметром, мерой которого служит константа связывания $K_{св}$.

Величина этого параметра определяет возможность применения тех или других антител. Иммуноанализ и гистохимические методы требуют антител с высоким сродством ($K_{св}=10^{-9}-10^{-10}$), чтобы комплексы антигена с антителами были очень прочными. С другой стороны, иммуноаффинная очистка лучше осуществляется с низкоаффинными антителами ($K_{св}=10^{-6}-10^{-7}$), поскольку в этих условиях адсорбция и освобождение антитела проходят при относительно мягких условиях без повреждения антигена и антител и колонка может использоваться повторно. Анализ взаимодействия антител с антигеном проводят по методу Скэтчарда (см. с. 343) с использованием радиоиммунного анализа.

Реактивы:

1. $^{125}\text{I}-\text{NaI}$ — 0,5 мКи.
2. Хлорамин Т.
3. На-фосфатный буфер — 0,4 М раствор, pH 7,5.
4. На-фосфатный буфер — 0,05 М раствор, pH 7,5.
5. Тиосульфат Na.
6. «Дауэкс» 1×8.
7. Сыворотка кролика.
8. Кроличьи антимышинные антитела.
9. NaCl — 0,15 М раствор.

Введение радиоактивной метки в антитела. Готовят на На-фосфатном буфере 0,05 М следующие растворы: хлорамин Т — 2 мг/мл, антитела — 1 мг/мл, тиосульфат Na — 2 мг/мл.

В полистироловую пробирку вносят по 100 мк раствора кроличьих антимышинных антител и На-фосфатного буфера 0,4 М. К смеси добавляют 1 мКи $^{125}\text{I}-\text{NaI}$. При непрерывном перемешивании добавляют 50 мкл раствора хлорамина Т. Инкубируют в течение 1 мин. Реакцию останавливают добавлением 200 мкл тиосульфата Na. «Дауэкс» суспендируют в 0,15 М NaCl и помещают в 1–2 мл колонку. Через колонку пропускают 1 мл кроличьей сыворотки для предотвращения неспецифического связывания антител. Реакционную смесь пропускают через колонку с «Дауэксом» для удаления несвязавшегося ^{125}I . Промывают колонку 1 мл 0,15 М NaCl. Раствор меченых антител (1 мл) смешивают с 1 мл 3%-ного раствора БСА в фосфатном буфере и хранят при 4°C.

Активность полученного препарата проверяют на γ-счетчике после разбавления исходного раствора 3%-ным раствором БСА в фосфатном буфере в соотношении 1:100. 50 мкл раствора антител должны давать от 50 000 до 100 000 cpm.

Определение константы связывания. Используют метод радиоиммунного анализа (РИА). Постановка метода сходна с постановкой ИФА (с. 320), с тем исключением, что вместо конъюгатов антител с ферментной меткой для выявления связывания антител с антигеном используют антимышинные антитела с радиоактивной меткой. В каждую лунку вносят по 50–100 мкл антимышинных антител (10–30 нг около 20 000 cpm). Инкубируют при комнатной температуре около 2 ч. Затем микропланшеты тщательно отмывают (с. 321), разрезают и индивидуальные лунки просчитывают в γ-счетчике.

Полученные данные наносят на график, где по оси абсцисс откладывают $AB_{св}$ (антитела, связанные с антигеном), а по оси ординат — отношение $AT_{св}$ к $AT_{своб}$ (антитела свободные). Через полученные

точки проводят прямую, параметры которой рассчитывают по методу наименьших квадратов. Тангенс угла наклона полученной прямой соответствует $K_{св}$.

IV. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ФЕРМЕНТОВ

1. ОЧИСТКА АНТИГЕНОВ НА ИММУНОСОРБЕНТЕ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Реактивы:

1. Моноклональные антитела к растворимому белковому антигену (*IgG* к регуляторной субъединице цАМФ-зависимой протеинкиназы).
2. BrCN — активированная сефароза 4В.
3. Бикарбонатный буфер — 0,1 М раствор, содержащий 0,5 М NaCl, pH 8,3.
4. Ацетатный буфер — 0,1 М раствор, содержащий 0,5 М NaCl, pH 4.
5. Глициновый буфер — 0,2 М раствор, pH 8.
6. Фосфатный буфер — 0,1 М раствор, pH 6,4.
7. Глициновый буфер — 2 М раствор, pH 2,8.
8. Трис-HCl — 2 М раствор, pH 8,6.

Приготовление иммуносорбента. BrCN-активированную сефарозу (1 г) обрабатывают, как обычно (с. 297). Полученный гель (3,5 мл) быстро промывают бикарбонатным буфером (pH 8,3) и вносят в раствор антител (20 мг антител в 10 мл бикарбонатного буфера). Инкубируют 2 ч при комнатной температуре, осторожно перемешивая механической мешалкой. Гель промывают в 100 мл того же буфера и переносят для блокирования оставшихся активных групп матрицы в 20 мл глицинового буфера 0,2 М, pH 8. Инкубируют 2 ч при комнатной температуре, постоянно осторожно перемешивая механической мешалкой. На воронке гель отмывают от несвязавшихся иммуноглобулинов и глицина бикарбонатным буфером (pH 8,3), затем ацетатным буфером, pH 4. Цикл повторяют, затем отмывают фосфатным буфером и хранят в нем при 4 °С.

Очистка антигена. Цитозольную фракцию из мозга свиньи (с. 379) пропускают через колонку с иммуносорбентом (1×2 см) в фосфатном буфере (pH 7,4) и колонку промывают тем же буфером. Элюцию проводят 2 М глициновым буфером (pH 2,8), фракции нейтрализуют 2 М трис-HCl буфером, pH 8,6. Определяют концентрацию белка, цАМФ-связывающую активность (с. 331): она не должна быть ниже 12 нмоль/мг. Проверяют чистоту полученного препарата регуляторной субъединицы (м. м.=56 000 Да) методом электрофореза (с. 119). Таким же способом, имея моноклональные или поликлональные антитела к соответствующим антигенам, можно получить гомогенные препараты этих антигенов.

2. СРАВНЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СТРУКТУР ИЗОФЕРМЕНТОВ И ФЕРМЕНТОВ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Определение структуры антигенных детерминант

Существуют два класса антигенных детерминант — конформационные и линейные. Конформационные детерминанты зависят от натив-

ной пространственной конформации белковой молекулы и состоят из аминокислотных остатков, не расположенных последовательно в полипептидной цепи, но благодаря укладке последней пространственно сближенных. В отличие от них линейные детерминанты представляют собой пептидные сегменты из 5—8 аминокислотных остатков. При изучении антигенной структуры фермента определяют структуры его антигенных детерминант путем изучения взаимодействия антител с пептидными фрагментами фермента.

Реактивы:

1. Лизоцим из куриного яйца.
2. Антитела к лизоциму.
3. Регуляторная субъединица цАМФ-зависимой протеинкиназы из мозга (RII).
4. Антитела к RII.
5. Все реактивы для ИФА (с. 320).

Лизоцим и RII в растворе с концентрацией 50 мкг/мл денатурируют кипячением. Берут два микропланшета для ИФА. На одном микропланшете, разделенном пополам, раститровывают нативный и денатурированный препараты лизоцима от 5 мкг до $5 \cdot 10^{-5}$ мкг в лунке. На другом аналогичным образом раститровывают препараты RII. Микропланшеты инкубируют в течение ночи при 4°C. Тщательно отмывают. Вносят в лунки соответствующие антитела к лизоциму и к RII, инкубируют в течение 1 ч при 37°C. Тщательно отмывают. Вносят конъюгаты антимышиных антител с ферментной меткой. Инкубируют в течение часа при 37°C. Тщательно отмывают, вносят субстрат. Через 30 мин реакцию останавливают (с. 319) и определяют оптическую плотность на спектрофотометре при соответствующей длине волны. Строят графики зависимости оптической плотности (ось ординат) от разведения антигена (ось абсцисс). Полученные графики должны свидетельствовать о том, что антигенные детерминанты лизоцима относятся к конформационным и разрушение нативной структуры фермента полностью разрушает антигенные детерминанты (отсутствует специфическое связывание с денатурированным ферментом). В отличие от лизоцима антигенные детерминанты RII — линейные (специфическое связывание с денатурированным препаратом сохраняется).

Сравнение антигенных структур изоферментов

Реактивы:

1. Регуляторная субъединица цАМФ-зависимой протеинкиназы RII.
2. Антитела к RII.
3. Регуляторная субъединица цАМФ-зависимой протеинкиназы RI.
4. Все реактивы для ИФА (с. 320).

Раститровывают препараты регуляторных субъединиц RI и RII в микропланшете для ИФА, разделенном пополам в концентрациях от 5 мкг до $5 \cdot 10^{-5}$ мкг в лунку (100 мкл). Инкубируют в течение ночи при 4°C, тщательно отмывают. Вносят по 100 мкл раствора антител к RII (5 мкг/мл), инкубируют в течение 1 ч при 37°C, тщательно от-

мывают. Вносят конъюгаты антимышиных антител с ферментной меткой, инкубируют в течение 1 ч при 37°С, тщательно отмывают. Вносят соответствующий субстрат. Через 30 мин определяют оптическую плотность на спектрофотометре и строят графики зависимости величины оптической плотности от разведения антигена. Полученные графики должны свидетельствовать о том, что антитела к RII не взаимодействуют с RI (отсутствует специфическое связывание). Следовательно, RII и RI иммунологически различны.

Сравнение антигенных структур белков из разных источников

Реактивы:

1. Инсулин свиной.
2. Инсулин бычий.
3. Все реактивы для ИФА (с. 320).
4. Антитела к свиному инсулину.

Готовят растворы двух препаратов инсулина в концентрации 100 мкг/мл и раститровывают в микропланшете для ИФА в концентрациях от 10 мкг до $5 \cdot 10^{-5}$ мкг в лунку. Инкубируют в течение ночи при 4°С, тщательно отмывают. В лунки вносят раствор антител к свиному инсулину в концентрации 10 мкг/мл по 100 мкл. Инкубируют в течение часа при 37°С, тщательно отмывают. Вносят конъюгат антимышиных антител с ферментной меткой и инкубируют в течение часа при 37°С. Тщательно отмывают и вносят соответствующий субстрат (с. 319). Через 30 мин определяют величину оптической плотности при соответствующей длине волны (с. 320). Строят графики зависимости величины оптической плотности от разведения антигена. Полученные графики должны свидетельствовать о том, что специфичность связывания антител к свиному инсулину значительно выше по сравнению со связыванием бычьего инсулина, хотя в последнем случае и наблюдается специфическое связывание. Такой результат свидетельствует о близком сходстве структур антигенных детерминант препаратов инсулина, однако исключает их тождество. Известно, что антигенные детерминанты этих двух белков различаются всего лишь одной аминокислотой.

Аналогичным образом можно оценивать антигенные структуры различных белков и ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дж. Келер. Методы получения гибридом//Иммунология. Методы исследований/Под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса. М., 1983. С. 313.
2. Моноклональные антитела. Гибридомы: новый уровень биологического анализа/Под ред. Р. Г. Кеннета, Дж. Мак-Керна, К. Б. Бехтола. М., 1983.
3. Остерман Л. А. Введение радиоактивной метки в белки//Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами/Под ред. Г. П. Георгиева. М., 1983. С. 236.
4. Методы исследований в иммунологии/Под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса. М., 1981.
5. Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева. 1982. Т. XXVII, № 4. С. 362.
6. Franklin E. C. The immune globulins — their structure and function and some techniques for their isolation//Progr. in Allergy. 1964. Vol. 8. P. 58.
7. Kervick R. A. The serum proteins in multiple myelomatosis//Biochem. J. 1940. Vol. 34. P. 1248.
8. Sober H. A., Gutter F. J., Wyckoff M. M. et al. Chromatography of protein. 11 Fractionation of serum protein on anion—exchange cellulose//J. Amer. Chem. Soc. 1956. Vol. 78. P. 756.

9. Kunkel H. G. Macroglobulins and high molecular weight antibodies//The Plasma Proteins/Ed. F. W. Putnam. 1960. Vol. 1. Chp. 8. P. 279.
10. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity//Nature. 1975. Vol. 256. P. 495.
11. Littlefield J. W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants//Science. 1964. Vol. 145. P. 709.
12. Galtre G., Howe S. C., Milstein C. et al. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines//Nature. 1977. Vol. 266. P. 550.
13. Köhler G., Milstein C. Derivation of specific antibody — produced tissue culture and tumor lines by cell fusion//Eur. J. Immunol. 1976. Vol. 6. P. 511.
14. Fahey J. L., Terry E. W.//Handbook of experimental immunology/Ed. Weir D. M. 1978. Vol. 1. Ch. 8.
15. Engvall E., Perlman P. Enzyme — linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G//Immunochemistry. 1971. Vol. 8, N 9.
16. Nakane P. K., Kawio A. Peroxidase labeled antibody a new method of conjugation//J. Histochem. Cytochem. 1974. Vol. 22, N 12.
17. Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A. Practicable microplate Enzyme — Immunoassays.//Protides of the biological fluids/Ed. H. Peeters. Pergamon Press. 1976. Vol. 24. P. 751.
18. Bullock S. L., Walls K. W. Evaluation of some of the parameters of the Enzyme — Linked Immunospecific Assay//J. Infect. Dis. 1977. Vol. 136. P. 279.
19. Schuurs A. H. W. M., Welmen van B. K. Enzyme — Immunoassays//Clin. Chim. Acta. 1977. Vol. 81. P. 1.
20. Camargo M. E., Takiguti C. K., Ferreira A. W. et al. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme — linked immunosorbent assays//Infect. Immun. 1978. Vol. 21. P. 55.
21. Methods in Enzymology/Ed. J. Hangone, H. Van Vunatis. N. Y., 1986. Vol. 121. P. 860.

Теоретическая направленность занятий в данном разделе практикума по биохимии связана с анализом основных высокоэффективных механизмов регуляции активности ферментов, обсуждаемых в настоящее время в учебной литературе и на страницах известных биохимических журналов. К таким механизмам относятся: аллостерический; механизм контроля активности, реализующийся на уровне существования множественных форм ферментов; механизм усиления, связанный с функционированием субстратных циклов; адсорбционный механизм контроля, реализующийся при обратимом взаимодействии ферментов с биологическими мембранами; регуляторный механизм с участием вторичных мессенжеров (цАМФ, Ca^{2+}) и универсальных модуляторов белковой природы (кальмодулин).

Обсуждаются методологические проблемы, связанные с изучением структурных особенностей белка, лежащих в основе регуляторных возможностей ферментов. В связи с этим исследуется роль аминокислотных остатков (SH-групп, гидрофобных областей белков), гомо- и гетеросубъединичных взаимодействий, а также роль микроокружения ферментов в реализации их каталитической функции. Кроме того, анализируются подходы к выявлению локализации на ферменте активных и регуляторных центров.

Объектом исследования служат ферментные препараты высокой степени гомогенности, а также ферменты в составе фракций субклеточных структур. В связи с этим проводится анализ активности ферментов, находящихся в растворе, в ограниченном мембранами пространстве (межмембранном пространстве и матриксе митохондрий), в адсорбированном на мембранах состоянии, а также в качестве структурных компонентов мембран (плазматических мембран, саркоплазматического ретикулула).

Поставленные задачи решаются на основе современных методов исследования ферментов. Практическая направленность занятий связана с освоением различных методов регистрации скоростей ферментативных реакций, включающих использование сопряженных ферментных систем и метода радиоактивного анализа. С целью определения активности мембранных ферментов осваиваются техника получения различных субклеточных структур и приемы работы с различными типами детергентов. Проблемы структурного анализа ферментов решаются с привлечением методов избирательной химической модификации белков, флуоресцентных методов, а также методов ковалентной и адсорбционной иммобилизации на различных носителях, включая искусственные фосфолипидные мембраны (липосомы). Кроме того, осуществляется практическое знакомство с различными аспектами кинетического исследования ферментов: осваиваются различные способы оценки кинетических параметров, ингибиторный анализ, проводится иссле-

дование сложных кинетических кривых. В некоторых случаях для построения теоретических зависимостей применяется компьютерная техника.

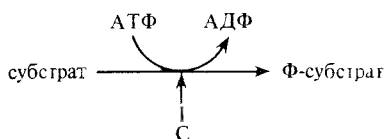
1. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОЧНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ

1. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ цАМФ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ¹

цАМФ-Зависимые протеинкиназы (КФ 2.7.1.37) состоят из субъединиц двух типов: регуляторной (R) и каталитической (C). В нативном состоянии холофермент цАМФ-зависимых протеинкиназ существует в виде неактивного тетрамера (R_2C_2). При связывании цАМФ тетрамер диссоциирует на субъединицы по схеме:



Свободная каталитическая субъединица активна и может катализировать реакцию фосфорилирования белковых субстратов:



В качестве донора фосфата используется АТФ, акцептором служат сериновые и треониновые аминокислотные остатки белков. Регуляторная субъединица выступает в данном случае в качестве ингибитора каталитической субъединицы. R обладает способностью связывать цАМФ как в составе холофермента, так и в свободном состоянии.

Целью работы является получение в частично очищенном состоянии нативного холофермента цАМФ-зависимой протеинкиназы, определение его цАМФ-связывающей активности, изучение способности диссоциировать под действием цАМФ и определение фосфотрансферазной активности свободной C.

Получение цАМФ-зависимой протеинкиназы из скелетных мышц кролика

Реактивы:

1. Буфер А: 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{KOH}$, 1 мМ ЭДТА, (рН 6,7), 4 мМ β -меркаптоэтанол.
2. Буфер Б: 80 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{KOH}$, 1 мМ ЭДТА, (рН 6,7), 4 мМ β -меркаптоэтанол.
3. ДЭАЭ-целлюлоза (ДЭ-52), уравновешенная буфером А.
4. Глицерин марки «чда» или перегнанный из «ч».
5. Буфер В: 5 мМ ЭДТА $\cdot$ КОН (рН 7,0–7,2), 4 мМ β -меркаптоэтанол.
6. КОН — 2 н. раствор.
7. Сульфат аммония (мелкокристаллический) марки «х.ч.» или перекристаллизованный из «чда».

¹ Работа предложена Петуховым С. П.

Все операции выполняются в холодной комнате; растворы предварительно охлаждаются до 4°C.

200 г измельченной массы скелетной мышцы кролика (приготовление см. на с. 221) гомогенизируют в четырех объемах буфера В в гомогенизаторе Уоринга 3 раза по 1 мин. Гомогенат центрифугируют при 10 000 *g* в течение 30 мин. Супернатант фильтруют через три слоя марли. Стакан с экстрактом помещают в кристаллизатор со льдом и доводят рН на рН-метре до 6,8—7,0. К экстракту добавляют 150 мл плотного осадка ДЭАЭ-целлюлозы и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30—40 мин. Ионообменнику дают осесть, жидкость сифонируют, ионообменник переносят в колонку (4×15 см). Колонку промывают буфером А до поглощения менее, чем 0,1 при 280 нм. Протеинкиназу элюируют буфером Б (примерно 150 мл) и к элюату добавляют сульфат аммония до 70%-ного насыщения (примерно 44 г на 100 мл элюата). Выпавший осадок белка собирают центрифугированием при 10 000 *g* в течение 40 мин, суспендируют в 10—15 мл буфера А и диализуют против 100 объемов того же буфера с 10%-ным глицерином в течение ночи. Денатурированный белок удаляют центрифугированием. К белковому раствору добавляют глицерин (примерно 1/3 объема). Определяют в препарате концентрацию белка по методу Спектора. Препарат хранят при -20°C в течение нескольких недель.

Определение цАМФ-связывающей активности

Реактивы:

1. Буфер Г: 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{KOH}$, 1 мМ ЭДТА (рН 6,5), 5 мМ теофиллин, 2 М NaCl.
2. цАМФ — 0,1 мМ раствор в воде, рН 6—7 по индикаторной бумаге.
3. Буфер Д: 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{KOH}$, рН 6,5.
4. $[8\text{-}^3\text{H}]$ цАМФ (Амершам).
5. Нитроцеллюлозные фильтры «Сын-пор» (24 мм) с диаметром пор 0,2 или 0,45 мкм.
6. Сцинтилляционная жидкость ЖС-106

Перед определением активности готовится среда инкубации и делается необходимое разведение протеинкиназы. К рассчитанному объему буфера Г добавляют нерадиоактивный цАМФ до концентрации 1 мкМ; радиоактивный цАМФ добавляется в таком количестве, чтобы в 10 мкл смеси был счет радиоактивности около 30 000 имп/мин (10 мкл из среды инкубации наносят на фильтр, сушат и просчитывают в сцинтилляторе ЖС-106). Разведение фермента проводят в отдельных пробках так, чтобы в 20 мкл раствора содержалось по 10, 20, 30, 40, 50 мкг белка соответственно. Среда инкубации раскапывают по 95 мкл в инкубационные пробирки. К пробам добавляют по 20 мкл соответствующего раствора протеинкиназы (в контрольную пробу добавляют 20 мкл буфера). Пробы инкубируют в холодильнике (или во льду) в течение 1,5—2 ч.

Перед фильтрацией нитроцеллюлозные фильтры раскладывают на кювете с фильтровальной бумагой. Под каждым фильтром подписывают на бумаге его порядковый номер. Колбу Бунзена подключают к водоструйному насосу, укладывают в воронку фильтр матовой стороной вверх. Фильтр сначала промывают 1 мл буфера Д и, не давая ему подсохнуть, наносят в его центр инкубационную смесь. После того

как вся жидкость впиталась в фильтр, проводят промывку холодным буфером Д (5—7 раз по 2 мл буфера). Фильтры выкладывают влажными на фильтровальную бумагу и сушат на воздухе. Затем просчитывают их радиоактивность в 5 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-106.

Удельную активность рассчитывают по формуле:

$$\text{Удельное связывание, } \frac{\text{нмоль}}{\text{мг}} = \frac{(\text{счет радиоактивности в опытной пробе} - \text{счет радиоактивности в контрольной пробе})}{(\text{общий счет радиоактивности в 95 мкл пробы} \times \text{количество белка в пробе, мг})} \times$$

$$\times \text{количество цАМФ в пробе с учетом количества радиоактивного цАМФ, нмоль.}$$

Определение фосфотрансферазной активности диссоциированного холофермента

Реактивы:

1. Буфер Е — 60 mM трис-HCl, 0,1 mM ЭГТА (pH 7,2), 5% -ный глицерин, 3 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреитол.
2. АТФ — 1 mM раствор в воде, pH 6—7 по индикаторной бумаге.
3. Гистон НI из тимуса теленка или сухой продажный гистоновый препарат («Олайн»).
4. Фильтры из бумаги ватман 3 MM (18×18 мм).
5. Трихлоруксусная кислота — 6% - и 10% -ный растворы.
6. Ацетон.
7. Раствор Ж — 0,5 M ЭДТА, 5 mM АТФ, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM пирогосфат натрия, pH 7,0.
8. цАМФ — 1 mM раствор в воде, pH 6—7 по индикаторной бумаге.
9. [γ -³²P]АТФ (Амершам).
10. Сцинтилляционная жидкость ЖС-106.

Перед определением активности готовят среду инкубации и делают соответствующие разведения фермента. К рассчитанному объему буфера Е добавляют АТФ до конечной концентрации 50 мкМ, гистон НI — до концентрации 3 мг/мл, цАМФ — до концентрации 10 мкМ, радиоактивный АТФ — в таком количестве, чтобы счет радиоактивности в 10 мкл среды составлял около 40 000 имп/мин (10 мкл среды наносят на фильтр, высушивают и просчитывают в сцинтилляторе ЖС-106 в «фосфорном» канале). Фермент разводят таким образом, чтобы в 20 мкл раствора было по 2, 3, 5, 7, 10 мкг белка соответственно. Фильтры нумеруют, подписывая их простым карандашом.

В инкубационные пробирки раскапывают по 50 мкл среды инкубации и помещают их в термостат на 30 °С. Реакцию начинают добавлением 20 мкл соответствующих растворов протеинкиназы. (Пробы заполняют последовательно через каждые 20 или 30 с, в контрольную пробу вносят 20 мкл Н₂О.) Через 10 мин реакцию останавливают добавлением 20 мкл раствора Ж. Аликвоты по 50 мкл из среды инкубации наносят на бумажные фильтры. Фильтры погружают в кристаллизатор с 10% -ной трихлоруксусной кислотой на 20 мин, затем отмывают 6% -ной трихлоруксусной кислотой (4—5 раз по 20 мин). Отмывку контролируют путем периодического обсчета контрольного филь-

ра во флаконе с 0,7%-ной трихлоруксусной кислотой в «трипиевом» канале. Когда счет радиоактивности в контрольном фильтре станет ниже, чем 100–200 имп/мин, отмывку прекращают, фильтры заливают ацетоном на 5–7 мин. Отмывку ацетоном проводят 2 раза. Фильтры выкладывают на фильтровальную бумагу и сушат на воздухе. Затем помещают во флаконы и заливают 5 мл сцинтиллятора ЖС-106. Счет радиоактивности определяют в «фосфорном» канале.

Удельную фосфотрансферазную активность рассчитывают по формуле:

$$\begin{aligned} & \text{Удельная активность, } \frac{\text{нмоль}}{\text{мг} \cdot \text{мин}} = \\ & = \frac{(\text{счет радиоактивности в опытной пробе} - \text{счет радиоактивности в контроле})}{\text{общий счет радиоактивности в пробе} \times \text{количество белка в пробе, мг}} \times \\ & \times \frac{\text{количество АТФ в пробе, нмоль} \times 1,8}{\text{время реакции, мин}}, \end{aligned}$$

где 1,8—пересчетный коэффициент.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гривенников И. А., Буларгина Т. В., Северин Е. С. цАМФ-зависимые протеинкиназы. Свойства, регуляции и биологические функции//Функциональная активность ферментов и пути ее регуляции/Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Кочетова. М., 1981. С. 30.
2. Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G. Preparation of homogenous cyclic AMP-dependent protein kinase and its subunits from rabbit skeletal muscle//Methods Enzymol. 1974. Vol. 38c. P. 299.
3. Gilman A. G. A protein binding assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate//Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 1970. Vol. 67, N 1. P. 305.
4. Johns E. W., Butler J. A. V. Further fractionation of histone from calf thymus//Biochem. J. 1962. Vol. 82, N 1. P. 15.
5. Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A symble and linear spectrophotometric assay for 0,5 to 50 U of protein//Anal. Biochem. 1978. Vol. 86, N 1. P. 142.

2. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПИРУВАТКИНАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Пируваткиназа принадлежит к группе ферментов гликолитической цепи и катализирует практически необратимую реакцию трансфосфорилирования между фосфоенолпируватом и Mg—АДФ с образованием пирувата и Mg—АТФ (с. 269).

Фермент является тетрамером и в тканях млекопитающих представлен тремя изоформами, среди которых наиболее распространен *L*-пируваткиназа, или печеночный изозим, и *M*₁-пируваткиназа, иначе мышечный изозим. Общеизвестным является представление о *L*-пируваткиназе печени как об одном из ключевых ферментов гликолиза. Проблема регуляторной роли *M*₁-пируваткиназы в контроле гликолиза в скелетной мышце остается нерешенной. Отчасти это связано с тем, что к пируваткиназе мышечной ткани применимы не все критерии, согласно которым, по современным представлениям, фермент может выдвигаться на роль ключевого. В частности, является спорным вопрос об аллостерической природе фермента, а также о проявлении им кооперативных свойств при взаимодействии с субстратами. Возможная причина противоречий связана, по-видимому, с выраженной конформационной подвижностью *M*₁-изозима пируваткиназы, вследствие чего фермент утрачивает кооперативные свойства при изменении рН или ионного состава среды.

целью работы является изучение, с помощью кинетических подходов возможности проявления пируваткиназой скелетных мышц аллоsterических и кооперативных свойств по отношению к субстратам и фенилаланину. Исследования проводятся на скелетных мышцах крысы с применением десенсибилизирующих воздействий на белок: изменения рН, низкой температуры, а также многоточечного дигандного связывания.

Реактивы:

1. Трис-НСl буфер — 50 мМ раствор, рН 7,5.
2. Трис-НСl буфер — 100 мл раствор, рН 7,2—8,4.
3. Фосфоенолпируват — 24 мМ раствор.
4. АДФ — 90 мМ раствор.
5. $MgCl_2$ — 180 мМ раствор.
6. KCl — 0,6 М раствор.
7. НАДН — 3 мМ раствор (свежеприготовленный).
8. Лактатдегидрогеназа — коммерческий препарат (разводят перед использованием 100 мМ трис-НСl буфером (рН 7,6) до конечной концентрации 60 инт. ед./мл).
9. Фенилаланин — 60 мМ раствор.
10. Аланин — 60 мМ раствор.

Получение растворимой клеточной фракции скелетных мышц крысы. Все процедуры по получению фракции проводят при 0°C. Среда выделения: 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5.

Мышцы (~5 г) задних конечностей декапитированного животного помещают в ледяную среду выделения. После охлаждения ткань обсушивают фильтровальной бумагой, переносят в чашку Петри, стоящую на льду, очищают от жира и соединительной ткани, измельчают ножницами. Навеску тканевой кашицы гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком, имеющим нарезку в 6-кратном по отношению к весу ткани объеме среды выделения. Тканевый гомогенат центрифугируют при 15000 g в течение 20 мин. Супернатант после центрифугирования, представляющий собой 14%-ную растворимую клеточную фракцию, фильтруют через 4 слоя марли и хранят порциями при -5°C в течение 2 нед. Размораживают при комнатной температуре и перед определением активности пируваткиназы разводят средой выделения до конечного разведения 1:200.

Определение активности пируваткиназы. Активность фермента определяют энзиматическим методом по количеству образовавшегося в ходе реакции пирувата. Метод основан на использовании сопряженной лактатдегидрогеназной реакции (с. 270). За ходом реакции следят на спектрофотометре по уменьшению оптической плотности при 340 нм в результате окисления НАДН. Показания прибора регистрируют каждые 30 с в течение 3 мин.

Состав реакционной среды объемом 3 мл: 100 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5; фосфоенолпируват 0,8 мМ; АДФ 3 мМ; $MgCl_2$ 6 мМ; KCl 100 мМ; НАДН 0,1 мМ; лактатдегидрогеназа 1 инт. ед.; растворимая клеточная фракция 0,02—0,1 мл. Контрольная проба не содержит Mg—АДФ. Реакцию начинают добавлением фосфоенолпирувата.

Расчет активности фермента проводят на основании величин начальной скорости реакции при условии наличия прямой пропорциональной зависимости скорости от количества ферментного препарата

в пробо. Активность фермента выражают в микромолах окисленного НАДН за 1 мин на 1 г ткани.

Способы представления данных по исследованию кооперативных взаимодействий

1. Оценка меры кооперативности в координатах Хилла. С использованием логарифмической шкалы строят график зависимости степени проявления эффекта от концентрации эффектора, т. е.

$$\lg \frac{a}{A-a} \text{ от } \lg [b],$$

где a — эффект, наблюдаемый при данной концентрации эффектора; A — максимально проявившийся эффект; $[b]$ — концентрация эффектора. Тангенс угла наклона графика к оси абсцисс дает значение коэффициента Хилла (N_H). По точке пересечения графика с осью абсцисс ($\lg \frac{a}{A-a} = 0$) можно определить величину $b_{0,5}$, т. е. концентрацию эффектора, при которой достигается 50%-ный эффект.

2. Оценка меры кооперативности в координатах Силоновой—Курганова (разностный метод). Строят график зависимости обратной величины скорости реакции от $\lg$ концентрации эффектора. На графике выбирают три точки с координатами:

$\{1/v_1, \lg [b_1]\}; \{1/v_2, \lg [b_2]\}; \{1/v_3, \lg [b_3]\}$, где $b_1 = b_2/\kappa$; $b_3 = b_2 \cdot \kappa$ ($\kappa > 1$).

Для случая, когда начальная скорость реакции v_0 в отсутствие эффектора, являющегося активатором, равна 0, коэффициент Хилла q рассчитывают по формуле:

$$q = \frac{\lg \left\{ \left(\frac{1}{v_1} - \frac{1}{v_2} \right) / \left(\frac{1}{v_3} - \frac{1}{v_2} \right) \right\}}{\lg \kappa},$$

где v_1, v_2, v_3 — скорости при концентрации эффектора b_1, b_2, b_3 .

Если эффектор является ингибитором фермента, коэффициент Хилла рассчитывают по формуле:

$$q = \frac{\lg \left\{ \left(\frac{1}{v_0 - v_{i,1}} - \frac{1}{v_0 - v_{i,2}} \right) / \left(\frac{1}{v_0 - v_{i,2}} - \frac{1}{v_0 - v_{i,3}} \right) \right\}}{\lg \kappa}.$$

Исходный график анализируют на нескольких участках, оценивают зависимость величин q от концентрации эффектора.

Изучение свойств пируваткиназы

1. Определяют активность пируваткиназы в растворимой клеточной фракции мышц в день выделения и после хранения препарата при -5°C .

2. Исследуют зависимость скорости реакции от концентрации фосфоенолпирувата в диапазоне $2 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ М и от концентрации АДФ в диапазоне $5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-4}$ М (при этом сохраняется соотношение АДФ:Мг=1:2). Исследования проводят на свежewedенном препа-

рате растворимой клеточной фракции, а также на препарате, дважды подвергнутом процедуре замораживания-оттаивания. Работу проводят при различных значениях рН среды — 7,2 и 8,4. Полученные данные обрабатывают с целью оценки величин K_m или $S_{0,5}$ по субстратам.

3. Исследуют зависимость скорости реакции от концентрации водородных ионов в диапазоне значений рН 7,2–8,4. В экспериментах используют 100 мМ трис-НСI буфер, перед определением активности фермент выдерживают при данном значении рН в течение 3 мин.

4. Исследуют влияние 10 мМ фенилаланина на активность пируваткиназы в диапазоне значений рН 7,2–8,4.

5. В оптимальных (по рН) условиях действия фенилаланина анализируют зависимость скорости реакции от концентрации ингибитора 0,1–10 мМ в отсутствие и в присутствии в среде инкубации 5 мМ аланина. В отдельном эксперименте исследуется влияние 5 мМ аланина на активность пируваткиназы. В работе используются свежевыделенные препараты растворимой клеточной фракции, а также после 2-кратного размораживания. Анализируют характер ингибирующего воздействия фенилаланина на пируваткиназу, оценивая N_H по эффектору.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М., 1977.
2. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М., 1978.
3. Райдер Е., Тейлор К. Изоферменты. М., 1983.
4. Weber G. Role of key enzymes in metabolic regulation//Mechanism of action and regulation of enzymes/Ed. T. Keleti. Budapest, 1975. Vol. 32. P. 237.
5. Phillips F., Ainsworth S. Allosteric properties of rabbit muscle pyruvate kinase//Int. J. Biochem. 1977. Vol. 8. P. 729.
6. Brown C. E., Teylor J. M., Chan L. Effect of pH on the interaction of substrates and effector to yeast and rabbit muscle pyruvate kinase//Biochim. Biophys. Acta. 1985. Vol. 829. P. 342.
7. Kenep R. G. Inhibition of muscle pyruvate kinase by creatin phosphate//J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248, N 11. P. 3963.

3. ИЗУЧЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦ

Лактатдегидрогеназа — фермент гликолитической цепи обмена углеводов, катализирующий обратимую реакцию превращения пирувиноградной кислоты в молочную с участием восстановленной и окисленной форм НАД (с. 273). В большинстве тканей млекопитающих лактатдегидрогеназа (ЛДГ) представляет собой тетрамер, образованный различным сочетанием двух типов субъединиц — М и Н, синтез которых контролируется двумя независимыми генными локусами. Из двух различных субъединиц в тканях формируются 5 изоформ лактатдегидрогеназы: H_4 , H_3M_1 , H_2M_2 , H_1M_3 , M_4 (в другом обозначении ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄, ЛДГ₅, где ЛДГ₁ и ЛДГ₅ — изоформы с соответственно максимальной и минимальной электрофоретической подвижностью). Для множественных форм фермента характерна достаточно выраженная органная специфичность. Так, изоформы лактатдегидрогеназы с высоким содержанием М-субъединицы широко представлены в мышечной ткани и в печени, обогащенные Н-субъединицей изоформы распространены в сердечной мышце и в мозге. Особенности первичной структуры боковых цепей и области активного центра М- и Н-субъединиц составляют основу для существенных различий в про-

явлении физико-химических и кинетических свойств изозимов. Точное знание изозимного состава фермента принципиально важно при моделировании метаболических путей как в условиях физиологической нормы, так и при различных патологических состояниях.

Цель работы — изучение структурных и функциональных свойств изозимов лактатдегидрогеназы в сердечной и скелетной мышцах крысы, являющихся критериями при установлении изозимного состава фермента в ткани.

Реактивы:

1. К-фосфатный буфер — 100 мМ раствор, рН 7,4.
2. Пируват натрия — 45 мМ раствор.
3. НАДН — 3 мМ раствор (свежеприготовленный).
4. Лактат натрия — 1 М раствор.
5. НАД — 10 мМ раствор.
6. Реактивы для электрофоретического исследования кислых белков в полиакриламидном геле.
7. Тетразолий нитросиний.
8. Феназинметосульфат.
9. Оксалаат натрия — 30 мМ раствор.

Получение растворимой клеточной фракции скелетной и сердечной мышц крысы

Все процедуры по получению клеточных фракций проводят при 0 °С.

Среда выделения: 100 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,4.

Навеску мышечной кашицы массой ~2–5 г (получение см. на с. 49) гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком, имеющим нарезку, в 6-кратном по отношению к весу ткани объеме среды выделения. Тканевый гомогенат центрифугируют при 15 000 *g* в течение 20 мин. Супернатант, представляющий собой 14%-ную растворимую клеточную фракцию, фильтруют через 4 слоя марли и хранят порциями при –5 °С в течение 2 нед. Размораживание растворимой клеточной фракции проводят при комнатной температуре. Перед определением активности лактатдегидрогеназы препарат разводят средой выделения до конечного разведения 1:200.

Получение гиалоплазмы. Тканевый гомогенат сердечной и скелетной мышц центрифугируют при 100 000 *g* в течение часа. Полученный супернатант представляет собой 14%-ную гиалоплазму. Препарат фильтруют через 4 слоя марли и разводят электродным буфером (с. 94) до конечного разведения 1:200.

Определение активности лактатдегидрогеназы проводят спектрофотометрическим методом в ходе восстановления пирувиноградной кислоты за счет окисления НАДН (с. 7). За ходом реакции следят по падению оптической плотности при 340 нм. Показания прибора регистрируют каждые 15 с в течение 2 мин.

Состав реакционной среды объемом 3 мл: 100 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,4; пируват натрия 1,5 мМ — для фермента скелетных мышц и 0,75 мМ — для фермента сердечной мышцы; НАДН — 0,1 мМ. Контрольная проба не содержит пируват натрия. Реакцию начинают добавлением ферментного препарата (20–100 мкл препарата).

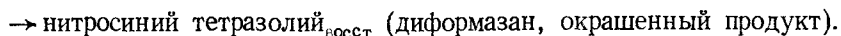
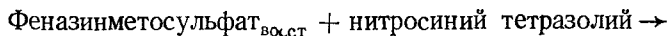
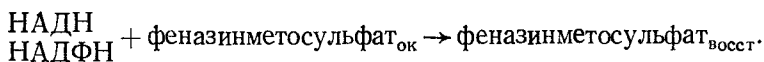
Расчет активности фермента проводят на основании величин начальной скорости реакции при условии наличия прямой пропорциональной зависимости скорости от количества ферментного препарата

в пробе. Активность фермента выражают в микромолях окисленного НАДН за 1 мин на 1 г ткани.

Исследование электрофоретической подвижности лактатдегидрогеназы методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (с. 94)

Для электрофоретического исследования используют гиалоплазму сердечной и скелетной мышц крысы в разведении 1:200. На гель наносят 50—100 мкл образца, утяжеленного равным объемом 40%-ной сахарозы. Камеру для электрофореза помещают в холодильник и проводят электрофорез при начальной силе тока 2 мА на гель в течение 10 мин, а затем при 4 мА на гель в течение 1,5—2 ч (свидетель бром-феноловый синий не доходит до конца геля на 0,3 см).

После окончания процедуры электрофореза проводят идентификацию белковых зон в геле, соответствующих положению в нем изоэлемов лактатдегидрогеназы. С этой целью гели инкубируют в среде для протекания обратной лактатдегидрогеназной реакции (с. 339). Образовавшийся в месте локализации фермента НАДН выявляют с помощью тетразолиевого метода, применяемого для тестирования дегидрогеназных реакций, протекающих с участием НАД или НАДФ. В основе тетразолиевого метода лежит образование неустойчивых хромогенных веществ — формазанов. Схематически образование формазанов может быть представлено следующей последовательностью реакций:



Из представленной схемы видно, что образующиеся в процессе ферментативной реакции восстановленные НАД и НАДФ не реагируют непосредственно с нитросиним тетразолием, в связи с чем в реакционную смесь включают промежуточный переносчик электронов между восстановленными никотинамидными коферментами и солями тетразолия, причем наиболее часто для этой цели используют феназинметосульфат

Применяя тетразолиевый метод, следует иметь в виду, что иногда образование формазанов в результате восстановления нитросинего тетразолия наблюдается не только за счет восстановленных никотинамидных коферментов, но и за счет неспецифических восстановителей.

Известно, что степень неспецифического восстановления тетразолиевых солей возрастает с увеличением рН среды инкубации, а при рН 9—10 образование окрашенных продуктов может идти самопроизвольно.

При изучении изоэлемного состава ферментов в тканевых экстрактах или в суспензиях субклеточных фракций, представляющих собой сложную смесь многих ферментов, необходимо ставить соответствующие контрольные пробы, в которых из инкубационной смеси, используемой для проявления активности определенных ферментов, исключаются субстраты.

При анализе полученных результатов путем сравнения зон окрашивания в контрольных и опытных столбиках геля выделяют полосы, специфичные для изучаемого фермента.

Результаты по изучению изозимного состава ферментов представляют в виде схем или фотографий, а также в виде денситограмм, полученных путем сканирования проявленных на активность гелей в денситометре.

Состав реакционной смеси для проявления активности лактатдегидрогеназы в полиакриламидном геле: К-фосфатный буфер 100 мМ, рН 7,4; лактат натрия 100 мМ; НАД 0,5 мМ; феназинметосульфат 40 мкг/мл; тетразолий нитросиний 400 мкг/мл.

Реакционную смесь готовят непосредственно перед определением активности. Инкубацию гелей проводят в темноте при температуре 37°С или при комнатной температуре в течение различных промежутков времени (10—60 мин). Оптимальным считается временной интервал, в течение которого происходит максимально полное выявление всех изозимов фермента. При этом не должна иметь место диффузия восстановленного тетразолия из специфических зон в свободные от лактатдегидрогеназы области геля. После проявления гелей на специфическую активность их фиксируют в 7%-ной уксусной кислоте.

Изучение свойств изозимов лактатдегидрогеназы

1. Определяют активность лактатдегидрогеназы в растворимой клеточной фракции скелетной и сердечной мышц крысы в день выделения и после хранения препарата при -5°С.

2. Исследуют изозимный состав лактатдегидрогеназы в гиалоплазме сердечной и скелетной мышц крысы методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле.

3. Изучают термостабильность лактатдегидрогеназы из разных источников, нагревая фермент (растворимая клеточная фракция) при 60°С в течение 10, 20, 30 мин. Оценивают защитный эффект 0,5 мМ НАДН от термоинактивации. С целью учета стабилизирующего влияния на лактатдегидрогеназу других белков цитозоля в качестве объекта исследования используют растворимую клеточную фракцию в разведении 1 : 7 и 1 : 200.

4. Исследуют зависимость скорости лактатдегидрогеназной реакции от концентрации пирувата натрия в диапазоне концентраций субстрата 0,02—2,5 мМ. Для разных препаратов фермента с помощью графических методов определяют значение K_m по пирувату.

Исследуют явление субстратного торможения реакции при высоких концентрациях пирувата вследствие образования непродуктивного тройного комплекса фермент — пируват — НАД. С этой целью ферментный препарат инкубируют в течение 10 мин в присутствии пирувата и 150 мкМ НАД при комнатной температуре. Реакцию начинают добавлением НАДН.

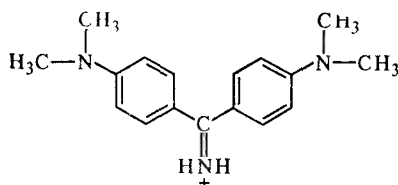
5. Изучают ингибирующее влияние оксалата натрия на лактатдегидрогеназу из разных источников. С этой целью исследуют зависимость скорости реакции от концентрации пирувата натрия: 0,02—0,15 мМ — для фермента, выделенного из сердечной мышцы, и 0,06—0,5 мМ — для фермента из скелетной мышцы в присутствии различных концентраций ингибитора: 0,1—1 мМ. Полученные данные обрабатывают в координатах Лайнуивера—Барка и Диксона. Определяют тип ингибирования различных препаратов лактатдегидрогеназы оксалатом, рассчитывают значения K_i по оксалату в отношении пирувата натрия.

1. Диксон М., Уэбб Э. Биология ферментов//Ферменты. М., 1983. Т. 3. С. 887.
2. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты. М., 1983.
3. Яковлева В. И. Изоферменты//Усп. биол. хим. 1968. Т. 9. С. 55.
4. Уилкинсон Дж. Изоферменты. М., 1968.
5. Диксон М., Уэбб Э. Кинетика действия ферментов//Ферменты. М., 1983. Т. 1. С. 82.
6. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., 1979.
7. Eventoff W. et al. Structural adaptation of lactate dehydrogenase isoenzymes//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74, N 7. P. 2677.

4. ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ КОФЕРМЕНТА И СУБСТРАТА

Для решения различных вопросов, встающих при исследовании структуры и функции ферментов, часто используется подход, связанный с введением в активный центр фермента аналогов кофермента, субстрата или ингибиторов реакции. В то же время в ряде случаев необходимо, чтобы активный центр мог свободно взаимодействовать с участниками реакции и ее ингибиторами. Информация о связывании лигандов в активном центре в этом случае может быть получена из других областей молекулы белка, чувствительных к состоянию активного центра.

При изучении изозима M_4 лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из мышц свиньи связывание НАД, пирувата и других соединений в активном центре фермента можно наблюдать с помощью флуоресцентного катионного зонда аурамина О, структура которого приведена на рисунке:



Молекула зонда равновесно присоединяется к белку в участках, неперекрывающихся с активными центрами. Флуоресцентные характеристики связанного аурамина О чувствительны к состоянию последнего. К изменению флуоресценции аурамина О ведет перестройка белкового окружения молекулы связанного зонда, возникающая под действием связавшихся в активном центре НАД, пирувата или адениловых нуклеотидов. Другими словами, между активным центром ЛДГ и аураминсвязывающим участком белка существует конформационная взаимосвязь.

Цель первой части работы — обнаружение на молекуле ЛДГ участков, способных к взаимодействию с аурамином О; демонстрация чувствительности флуоресцентных характеристик связанного аурамина О к взаимодействию ЛДГ с коферментом, субстратом и ингибитором реакции; определение значения константы диссоциации (K_d) комплекса НАД—ЛДГ по флуоресценции аурамина О.

Во второй части работы предлагается выяснить, определяются ли конформационные изменения аураминсвязывающего участка состоянием активного центра той субъединицы, на которой находится этот участок, или конформационная взаимосвязь существует между активным центром одной субъединицы и аураминсвязывающим участком другой. Для решения этого вопроса проводится теоретический анализ

взаимодействия олигомерного белка с двумя лигандами в равновесной системе. В данном случае один из них — НАД, другой — аурамин О. По результатам анализа строятся графики зависимости концентрации субъединиц белка, находящихся в комплексе с обоими лигандами одновременно или только с НАД, от количества добавленного в систему НАД. Экспериментально определяется зависимость изменений флуоресценции аурамина О при титровании коферментом комплекса ЛДГ — зонд. Сравнивая полученную в эксперименте кривую с рассчитанными теоретически, можно дать ответ на поставленный вопрос.

Реактивы:

1. Лактатдегидрогеназа из мышц свиньи — коммерческий препарат фирмы «Reanal» (препарат трижды перекристаллизовывают путем добавления насыщенного раствора сульфата аммония (рН 7,0) к раствору белка до помутнения. Очищенный таким образом препарат является апоферментом M_4).
2. Аурамин О — перекристаллизовывают из воды в присутствии 20 мМ NaCl при 30°C.
3. К-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,0, содержащий 5 мМ ЭДТА.
4. Аурамин О — 1,5 мМ раствор.
5. НАД — 120 мМ раствор.
6. Пируват натрия — 120 мМ раствор.
7. АДФ — 180 мМ раствор.

Характеристика связывания аурамина О с апоформой ЛДГ

Флуориметрические исследования проводят на спектрофлуориметре в кювете, имеющей четыре прозрачные грани. Интенсивность флуоресценции регистрируют при 517 нм под прямым углом к возбуждающему свету, используя длину волны возбуждения 480 нм. Кюветное отделение термостатируют при 20°C.

Все измерения ведут в 0,1 М К-фосфатном буфере, содержащем 5 мМ ЭДТА, рН 7,0. Апо-ЛДГ предварительно обессоливают на колонке с сефадексом G-50, уравновешенной тем же буфером. Концентрацию белка определяют спектрофотометрически, используя $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ при 280 нм = 14 (м.м. = 140 000 Да).

Раствор аурамина О готовят на том же буфере, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $4,41 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 430 нм. Титрование ЛДГ аурамином О проводят непосредственно во флуориметрической кювете, добавляя к раствору белка конечной концентрации $4,4 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ раствор аурамина О так, чтобы его конечные концентрации менялись от $1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ до $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. В качестве контроля снимают флуоресценцию тех же концентраций аурамина О в отсутствие белка. Значения интенсивности флуоресценции исправляют на флуоресценцию свободного зонда и на разведение белка при добавлении аурамина О (следует использовать минимальные объемы раствора красителя). Учитывают влияние эффекта внутреннего фильтра по формуле:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{2,3 \cdot A (a_2 - a_1)}{10^{-A} a_1 - 10^{-A} a_2}, \quad (1)$$

где a_1 и a_2 — параметры кюветного отделения (рис. 44); A — оптиче-

ская плотность образца при длине волны возбуждения; Φ — измеренная интенсивность флуоресценции; $\Phi_0 = \Delta\Phi$ — исправленная величина интенсивности флуоресценции, используемая в работе.

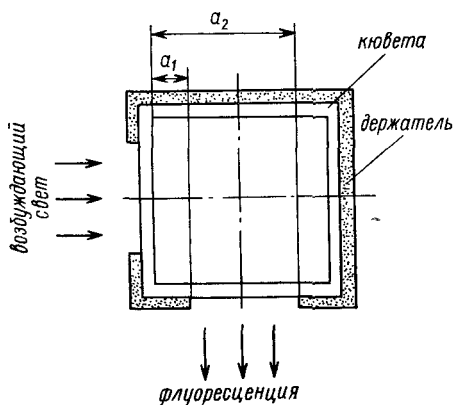


Рис. 44. Определение параметров кюветно-отделения для учета эффекта внутреннего фильтра

Наблюдаемое увеличение флуоресценции зонда в присутствии белка отражает связывание аурамина О с ЛДГ, т. е.

$$\Delta\Phi = K \cdot [\text{аурмин О}]_{\text{св.}} \quad (2)$$

Для количественного анализа взаимодействия проводят другой эксперимент, в котором определяют максимальный прирост интенсивности флуоресценции зонда при его полном связывании с белком. При этом постоянную низкую концентрацию аурамина О (которую выбирают таким образом, чтобы можно было зарегистрировать флуоресценцию зонда в буфере) титруют нарастающими количествами фермента. Строят график двойных обратных величин и проводят экстраполяцию к бесконечной концентрации белка. Таким образом устанавливают значение интенсивности флуоресценции данной концентрации зонда при его полном связывании с ЛДГ. Соотношение полученной величины с флуоресценцией данной концентрации зонда в буфере показывает, во сколько раз увеличивается флуоресценция аурамина О при связывании. Используют несколько концентраций аурамина О для титрования белком, что повышает точность определения величины прироста флуоресценции (Φ_{max}). В этих экспериментах

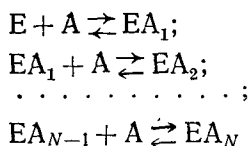
$$\Phi_{\text{max}} = K \cdot [\text{аурмин О}]_{\text{св.}}$$

причем концентрация связанного зонда равна его общей концентрации в растворе. Отсюда можно определить значение коэффициента K . Подставляя это значение в уравнение (2), предварительно определив величины $\Delta\Phi$, можно рассчитать концентрацию связанного аурамина О в каждой точке кривой титрования фермента зондом². Так как общая концентрация аурамина О известна, равновесная концентрация свободного зонда легко может быть вычислена.

² Так как используемые значения Φ_{max} и $\Delta\Phi$ не являются относительными величинами, следует определять их при одной и той же чувствительности прибора, либо переходить к относительным величинам.

Полученные данные используют для определения типа связывания, количества участков связывания аурамина О на молекуле белка и величины K_d комплекса белка с зондом.

Равновесное взаимодействие молекулы белка (Е) с лигандом (А) можно представить так:



Такой процесс описывается уравнением

$$\frac{[E]_0}{[A]_{св}} = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{k}{[A]_{своб}} \right),$$

где $[E]_0$ — общая концентрация фермента. Для анализа это уравнение обычно используют в форме, предложенной Скэтчардом:

$$\frac{v}{[A]} = \frac{N}{k} - \frac{1}{k} v, \quad (3)$$

где v — количество молей лиганда, связанных с молем белка ($v = \frac{[A]_с}{[E]_0}$); k — микроскопическая константа диссоциации; A — концентрация свободного лиганда.

Данные, полученные в эксперименте, представляют в виде графика Скэтчарда, откладывая по оси абсцисс значения v , а по оси ординат — $v/[A]$. При связывании лиганда в равноценных и не взаимодействующих участках экспериментальные точки образуют прямую, экстраполяция которой на ось абсцисс дает значение N , а наклон равен $-1/k^3$.

Нативный препарат ЛДГ дает обычно около 4 независимых участков связывания аурамина О и значение k , близкое к $1 \cdot 10^{-4}$ М.

Влияние состояния активного центра ЛДГ на флуоресценцию связанного аурамина О

Изучают влияние НАД, пирувата и АДФ на флуоресценцию аурамина О, связанного с ЛДГ. Для этого вначале снимают спектр флуоресценции раствора, содержащего 0,04 мМ апо-ЛДГ и 0,15 мМ аурамина О в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 5 мМ ЭДТА, а затем добавляют к пробе лиганды в следующих конечных концентрациях: 6 мМ НАД, 6 мМ пируват, 9 мМ АДФ. Регистрируют увеличение флуоресценции комплекса аурамина О с ЛДГ под действием использованных соединений. Ставят контроль, в котором учитывают влияние добавок на флуоресценцию зонда в отсутствие белка. Рост интенсивности эмиссии связанного с белком аурамина О может быть обусловлен либо увеличением его количества, либо изменением флуоресцентных характеристик зонда. В любом случае увеличение флуоресценции зонда при связывании лигандов в активном центре свидетельствует о конформационной перестройке участков моле-

³ График, имеющий вид вогнутой кривой, может быть обусловлен либо отрицательной кооперативностью связывания лиганда, либо существованием на макромолекуле участков связывания с различными константами диссоциации. В случае положительной кооперативности при связывании лиганда график имеет вид выпуклой кривой.

кулы белка, находящихся вне активного центра в результате взаимодействия последнего с коферментом, субстратом и ингибитором.

Чтобы сделать выбор между двумя возможными объяснениями эффекта, определяют концентрацию НАД, необходимую для получения холоформы ЛДГ, добавляя к комплексу апо-ЛДГ с зондом (с. 340) НАД до тех пор, пока флуоресценция аурамина О не перестанет увеличиваться. Затем в отдельной пробе титруют холо-ЛДГ аурамином О (так же, как апо-ЛДГ); определяют число участков и величину k для комплекса аурамина О с холо-ЛДГ. В случае совпадения полученных значений с величинами, определенными для апофермента, увеличение интенсивности флуоресценции зонда при связывании НАД с апо-ЛДГ объясняют изменениями структуры аураминсвязывающих областей молекулы белка в результате изменения состояния активного центра.

Определение прочности связывания кофермента (НАД) по флуоресценции комплекса ЛДГ с аурамином О

Взаимодействие НАД с ЛДГ достаточно трудно изучать обычными спектральными методами. Увеличение флуоресценции связанного с ЛДГ зонда под действием НАД позволяет определить значение k для кофермента в комплексе ЛДГ — НАД — аурамин О по изменениям эмиссии последнего. Для этого регистрируют флуоресценцию пробы, содержащей 0,03 мМ апо-ЛДГ и 0,15 мМ аурамин О, после чего титруют данный комплекс раствором НАД до его конечной концентрации 2,5 мМ. Ставят контроль, в котором учитывают влияние использованных концентраций НАД на флуоресценцию той же концентрации свободного зонда. В полученной кривой титрования прирост флуоресценции пропорционален концентрации связывающегося кофермента.

Анализ полученных результатов проводят по методу, предложенному Д. Холбруком. Его основой является уравнение

$$k \left(\frac{1}{1-\alpha} \right) = \frac{L_0}{\alpha} - E_0,$$

где L_0 — общая концентрация лиганда, в данном случае НАД; E_0 — концентрация участков связывания лиганда, в данном случае концентрация активных центров ЛДГ; k — константа диссоциации комплекса НАД—ЛДГ в присутствии аурамина О; α — степень насыщения активных центров коферментом.

Значения α находят из отношения $\Delta\Phi/\Delta\Phi_{\max}$, где $\Delta\Phi_{\max}$ — изменение флуоресценции связанного зонда при насыщающей концентрации НАД, $\Delta\Phi$ — изменение флуоресценции при данной концентрации НАД. При графическом представлении данных по оси абсцисс откладывают L_0/α , по оси ординат — $1/(1-\alpha)$. Величину k находят как котангенс угла наклона полученной прямой. Определенное значение k сравнивают со значениями этой величины, известными из литературы и равными 0,5 мМ. Аналогичным образом может быть определено значение k для комплексов пирувата и АДФ с ЛДГ по их влиянию на флуоресценцию связанного с ЛДГ аурамина О.

Равновесное связывание лигандов с олигомерным белком

В этой части работы проводится теоретический анализ взаимодействия одного и двух лигандов с молекулой белка, имеющей четыре

идентичных и независимых центра связывания для каждого из лигандов, в качестве которых в работе выступают аурамин О и НАД.

Связывание одного лиганда. При заданных значениях E_0 и A_0 в пробе одновременно присутствуют комплексы белка с лигандом с различной степенью насыщения (т. е. EA_1 , EA_2 , EA_3 и EA_4), а также свободный белок в равновесной концентрации E . Определение их концентрации и является целью дальнейшего анализа.

Участки связывания характеризуются одинаковыми величинами микроскопической константы ассоциации комплекса белок — лиганд. Таким образом, для первой молекулы лиганда существует равная вероятность взаимодействия с любым из центров связывания (на рис. 45 макромолекула схематически изображена в виде квадрата с четырьмя

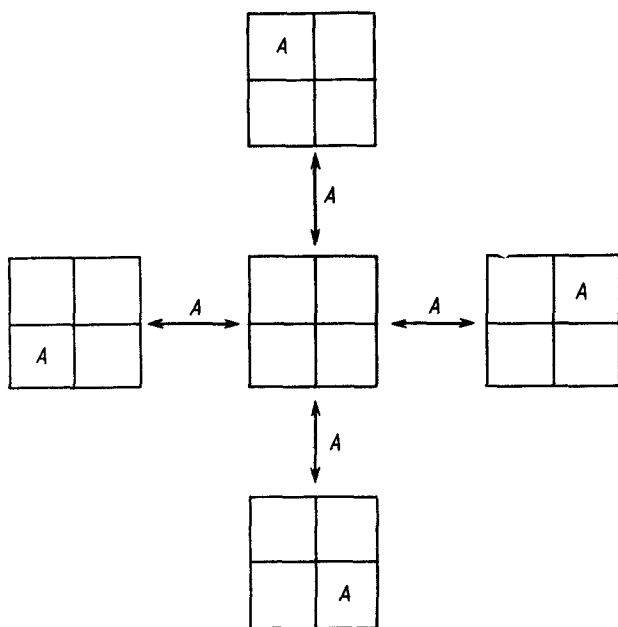


Рис. 45. Равновесное связывание молекулы лиганда с тетрамерной молекулой белка

центрами связывания). В результате возникает набор микроскопических форм EA_1 . Каждая из них при этом представлена в равных количествах. Комплекс EA_2 представлен шестью подобными микроскопическими формами, комплекс EA_3 — четырьмя, комплекс EA_4 — одной.

Концентрацию комплекса EA_i можно выразить через концентрацию любой другой формы:

$$[EA]_i = \frac{[EA]_{i-1} [A]}{K_i},$$

где K_i — макроскопическая константа, которая включает весь набор форм, обозначенных EA_i и EA_{i-1} .

Для K_1 соотношение макро- и микроскопической констант выглядит следующим образом:

$$K_1 = \frac{\begin{array}{|c|c|} \hline A & \\ \hline \hline & \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|c|} \hline & A \\ \hline \hline & \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline \hline A & \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline \hline & A \\ \hline \end{array}}{[E] \cdot [A]} = 4k.$$

Соответственно для второй, третьей и четвертой молекул лиганда можно вывести соотношение между макро- и микроскопическими константами ассоциации данных комплексов:

$$K_2 = (3/2)k, \quad K_3 = (2/3)k, \quad K_4 = (1/4)k.$$

Концентрации комплексов макромолекулы с различной степенью насыщения лигандом можно получить, подставляя приведенные значения констант ассоциации в уравнение закона действующих масс:

$$[EA]_1 = K_1 [E] [A] = 4k [E] [A],$$

$$[EA]_2 = K_2 [EA]_1 [A] = (3/2)k [EA]_1 [A] = 6k^2 [E] [A]^2,$$

$$[EA]_3 = K_3 [EA]_2 [A] = (2/3)k [EA]_2 [A] = 4k^3 [E] [A]^3,$$

$$[EA]_4 = K_4 [EA]_3 [A] = (1/4)k [EA]_3 [A] = k^4 [E] [A]^4.$$

В общем виде

$$K_i = \frac{N-i+1}{i} k$$

и

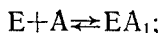
$$[EA]_i = [EA]_{i-1} \left(\frac{N-i+1}{i} \right) k [A],$$

где K — макроскопическая константа ассоциации; k — микроскопическая константа ассоциации, определенная экспериментально, как изложено выше; $[A]$ — равновесная концентрация свободного лиганда; $[EA]_i$ — концентрация i -комплекса EA ; N — количество участков взаимодействия лиганда с белком, известное из предыдущих экспериментов.

Анализ такой системы позволяет определить концентрации комплексов EA_1 , EA_2 , EA_3 , EA_4 и равновесную концентрацию свободного белка E в пробе при заданных значениях E_0 и A_0 . Известными величинами являются k , E_0 и A_0 , что достаточно для решения системы уравнений, описывающих процесс связывания.

Расчет проводится по следующей схеме.

В результате первого акта связывания образуется некоторая концентрация комплекса EA_1 :



$$[EA]_1 = [E] [A] 4k.$$

Обозначим $EA_1 = X_1$, тогда

$$X_1 = (E_0 - X_1) (A_0 - X_1) 4k$$

и

$$X_1^2 - [E_0 + A_0 + (1/4)k] X_1 + E_0 A_0 = 0.$$

Один из корней этого квадратного уравнения является концентрацией комплекса EA_1 , другой не удовлетворяет условиям эксперимента. Полученная величина X_1 , однако, не является истинным значением $[EA_1]$, так как образовавшийся комплекс EA_1 вступает в реакцию со второй молекулой лиганда:



Обозначим $[EA]_2 = X_2$, тогда

$$\frac{X_2}{(X_1 - X_2)A} = (3/2)k.$$

Учитывая, что $A_0 \gg E_0$ и ошибка эксперимента находится в пределах 10%, величину равновесной концентрации свободного лиганда A можно приравнять A_0 . Решая данное уравнение относительно X_2 , определяем концентрацию образовавшегося комплекса EA_2 . Теперь можно определить реальную концентрацию комплекса EA_1 :

$$[EA]_1 = X_1 - X_2.$$

В общем виде

$$\frac{EA}{(X_1 - X_2)} + A \rightleftharpoons \frac{EA_2}{X_2} \quad (3/2)k = \frac{X_2}{(X_1 - X_2)A};$$

$$\frac{EA_2}{(X_2 - X_3)} + A \rightleftharpoons \frac{EA_3}{X_3} \quad (2/3)k = \frac{X_3}{(X_2 - X_3)A};$$

$$\frac{EA_3}{(X_3 - X_4)} + A \rightleftharpoons \frac{EA_4}{X_4} \quad (1/4)k = \frac{X_4}{(X_3 - X_4)A}.$$

Реальные концентрации комплексов равны:

$$EA_1 = X_1 - X_2; \quad EA_2 = X_2 - X_3; \quad EA_3 = X_3 - X_4; \quad EA_4 = X_4;$$

$$E = E_0 - \sum_{i=1}^4 EA_i.$$

Таким образом, в результате проведенного анализа определяют концентрации комплексов белка с лигандом, имеющих разную степень насыщения.

Определение концентрации субъединиц, одновременно занятых двумя лигандами, которые не влияют на связывание друг друга с белком. В предыдущем подразделе было описано взаимодействие лиганда с тетрамерным белком в равновесной системе (с. 344), при котором существует определенное распределение комплексов EA . Добавление к системе лиганда B приводит к усложнению ситуации и требует описания взаимодействия его с комплексами EA_1 , EA_2 , EA_3 и EA_4 . Анализ связывания второго лиганда в таких условиях основывается на следующих предположениях, которые выполняются в случае взаимодействия ЛДГ с аурамином O и с НАД: 1) все участки связывания аурамина O идентичны и независимы друг от друга; 2) все активные центры ЛДГ идентично и независимо связывают НАД; 3) взаимодействие ЛДГ с аурамином O не влияет на связывание НАД и наоборот.

В этом случае одновременное распределение обоих лигандов A и B по субъединицам белка можно представить в том виде, как это показано на рис. 46 для связывания НАД с комплексом EA_1 .

Аналогичным образом происходит связывание лиганда В с комплексами EA_2 , EA_3 и EA_4 . Следует отметить, что вероятность одновре-

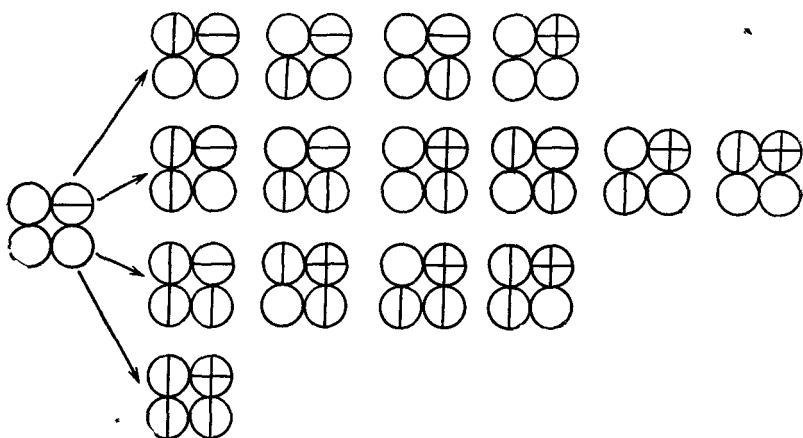


Рис. 46. Схематическое изображение равновесного связывания двух лигандов с олигомерным белком

менного присутствия А и В в одной субъединице различна для комплексов EA_i с разной степенью насыщения. Ее величины приведены в табл. 3.

Таблица 3

	EA_1	EA_2	EA_3	EA_4
EB_1	1/4	1/2	3/4	1
EB_2	1/4	1/2	3/4	1
EB_3	1/4	1/2	3/4	1
EB_4	1/4	1/2	3/4	1

Для определения концентрации субъединиц, одновременно занятых обоими лигандами, вначале отдельно рассчитывают концентрации EA_i и EB_i так, как это описано в предыдущем подразделе, используя заданные значения E_0 , A_0 , B_0 и определенные в эксперименте величины k_A и k_B (k_B — микроскопическая константа ассоциации комплекса ЛДГ–НАД). Далее определяют долю каждого комплекса EA_i в общей популяции форм ЛДГ как $[EA]_i/E_0$. Умножая долю комплекса EA_i на соответствующие вероятности связывания второго лиганда В в той же субъединице этого комплекса и на концентрацию комплексов EB_1 , EB_2 , EB_3 и EB_4 , рассчитывают концентрацию субъединиц молекулы ЛДГ, одновременно занятых лигандами А и В (обозначена как $[EAB]$):

$$[EAB] = ([EB]_1 + 2[EB]_2 + 3[EB]_3 + 4[EB]_4) \times$$

$$\times \frac{0,25 [EA]_1 + 0,5 [EA]_2 + 0,75 [EA]_3 + [EA]_4}{[E]_0}$$

или

$$[EAB] = \sum_{i=1}^4 [EB] \cdot \sum_{i=1}^4 [EA]_i \frac{i}{4 [E]_0}.$$

Концентрацию субъединиц, занятых только лигандом В ($[EB]$), определяют как

$$[EB] = \sum_{i=1}^4 [EB]_i - [EAB].$$

Передаются ли в молекуле ЛДГ конформационные изменения, вызываемые связыванием НАД в активном центре одной субъединицы, на другую субъединицу?

Для ответа на поставленный вопрос проводится титрование комплекса ЛДГ с аурамином О нарастающими концентрациями НАД. Проба содержит апо-ЛДГ и аурамин О в конечных концентрациях 45 мкМ и 0,15 мМ соответственно. Регистрируют интенсивность флуоресценции пробы, после чего добавляют нарастающие концентрации НАД до конечной концентрации 6 мМ. Эксперименты проводят в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 5 мМ ЭДТА, при 20°C. Кюветное отделение термостатируют. Длина волны возбуждения — 480 нм, интенсивность флуоресценции измеряют при 517 нм. В качестве контроля используют пробу, в которой к тем же концентрациям ЛДГ и аурамина О добавляют буфер вместо раствора НАД. Таким образом получают экспериментальную кривую зависимости флуоресценции от концентрации НАД.

С помощью ЭВМ, используя программу, приведенную на с. 350, проводят теоретический расчет концентрации субъединиц ЛДГ, занятых одновременно аурамином О и НАД, и субъединиц, занятых только НАД. При расчете необходимо учитывать, что внесение НАД в пробу приводит к некоторому изменению концентраций ЛДГ и аурамина О, т. е. значения $[E]_0$ и $[A]_0$ в начале и в конце кривой титрования различны. Подобная постановка эксперимента позволяет получить качественную разницу между двумя рассчитанными кривыми. Зависимость концентрации субъединиц, занятых только НАД, от его концентрации представляет собой обычную кривую насыщения. Концентрация субъединиц, несущих одновременно оба лиганда, зависит от количества добавленного НАД более сложным образом. Вначале она растет подобно предыдущей кривой, но в дальнейшем, пройдя через слабо выраженный максимум, начинает снижаться. Причиной подобного поведения кривой является то, что при титровании пробы, исходно содержащей ЛДГ и аурамин О, добавками НАД происходит разведение системы. Его результатом является некоторая диссоциация комплекса ЛДГ — аурамин О.

В начальной стадии титрования процесс образования тройного комплекса субъединиц белка с аурамином О и НАД опережает диссоциацию аурамина О из комплекса из-за разведения при добавках НАД. В дальнейшем диссоциация аурамина О из комплекса с белком становится явной, что и приводит к описанному снижению концентрации этого типа субъединиц в области больших добавок НАД.

```

10 DIM E(4,2)
20 REM E(1,1)=EA1.....E(1,2)=EB1
30 INPUT «A.B.E.KA.KB»:A.B.E.K1.K2
100 L1=A \ C1=K1
105 For I=1 TO 2
110 GOSUB 1000
120 E(1,I)=X1-X2 \ E(2,I)=X2=X3 \ E(3,I)=X3=X4 \ E(4,I)=X4
130 L1=B C1=K2
140 NEXT I
150 O1=O \ O2=O
160 FOR J=1 TO 4
170 O1=O1+E(J,2)*J \ O2=O2+E(J,1)*J/(4*E)
180 NEXT J
220 PRINT «EAB=»:O1*O2. «EB=»:O1-O1*O2
1000 X1=(E+L1+O.25*C1)/2
1005 X1=X1-SQR(X1^2-E*L1)
1010 Y1=L1*C1
1020 X2=3*Y1*X1/(2+3*Y1)
1030 X3=2*Y1*X2/(3+2*Y1)
1040 X4=Y1*X3/(4+Y1)
1050 RETURN
1060 END

```

Программа для расчета концентрации субъединиц, связавших одновременно два лиганда и связавших один лиганд. Программа составлена Громовым А. И. (кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ).

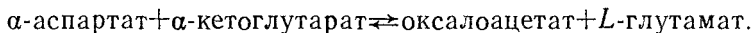
Таким образом, рассчитанные кривые зависимости двух типов субъединиц от концентрации НАД имеют различный характер. С ними сравнивают экспериментально полученную кривую зависимости флуоресценции связанного аурамина О от концентрации добавленного НАД. В случае ее совпадения с ходом кривой, описывающей концентрацию субъединиц, одновременно занятых аурамином О и НАД, можно заключить, что конформационные изменения белка под действием НАД, отражающиеся на свойствах аураминсвязывающих областей молекулы, локализованы внутри одной субъединицы. При несовпадении экспериментальной кривой с зависимостью, полученной для этого типа субъединиц, ее сравнивают с поведением рассчитанной кривой для субъединиц, находящихся в комплексе только с НАД. Корреляция двух кривых в этом случае указывает на чувствительность аураминсвязывающих зон одной субъединицы к связыванию НАД в активном центре другой. Если между экспериментально полученной кривой и суммой обеих рассчитанных соответствие наилучшее, делают заключение о том, что состояние белкового окружения связанного аурамина О чувствительно как к связыванию кофермента в активном центре той же субъединицы, так и к состоянию активного центра субъединицы, свободной от аурамина О. Таким образом, два последних варианта указывают на передачу сигнала между активным центром одной субъединицы молекулы ЛДГ и катионсвязывающим участком другой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Паркер С. Фотолуминесценция растворов. М., 1972.
2. Кантор Ч., Шиммел П. Взаимодействие макромолекул с лигандами в условиях равновесия//Биофизическая химия. М., 1985. Т. 3. С. 6.
3. Лаклович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
4. Иванов М. В., Кубе Д., Наградова Н. К. The use of auramine O to study ligand binding and subunit cooperativity of lactate dehydrogenase//Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 789. P. 216.
5. Holbrook J. J. Protein fluorescence of lactate dehydrogenase//Biochem. J. 1972. Vol. 128, N 3. P. 921.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ИЗОЗИМОВ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ

Аспартаминотрансфераза (*L*-аспартат : 2-оксоглутарат-амино-трансфераза, КФ 2.6.1.1) катализирует обратимую в физиологических условиях реакцию трансаминирования между *L*-аспарагиновой и α -кетоглутаровой кислотами с образованием щавелевоуксусной и *L*-глутаминовой кислот:



Фермент широко распространен в тканях млекопитающих и представлен двумя изозимами, пространственно разобщенными в клетке. Один изозим локализован в цитозоле, другой связан с митохондриальной фракцией. Изозимы существенно различаются по аминокислотному составу, физико-химическим свойствам, зависимости активности от pH среды и, что особенно важно с физиологической точки зрения, по кинетическим свойствам. Различное сродство к субстратам реакции ставит изозимы фермента в разные условия в отношении доступности субстратов прямой и обратной реакций. Этим определяется бифункциональность поведения аспартаминотрансферазы в печени: реакция, катализируемая митохондриальным изоимом, может быть сдвинута от состояния равновесия в сторону образования α -кетоглутарата, и поэтому может быть связана с функционированием цикла Кребса и цикла мочевины. Наоборот, цитоплазматический изоим способствует образованию щавелевоуксусной кислоты, т. е. связан с функционированием глюконеогенеза.

Целью работы является изучение pH-зависимости активности и кинетических свойств аспартаминотрансферазы, локализованной в цитоплазме и митохондриях печени крысы. Кроме того, в работе исследуется внутримитохондриальная локализация фермента.

Реактивы:

1. К-фосфатный буфер — 100 мМ раствор, pH 6,5—7,5.
2. Трис-HCl буфер — 100 мМ раствор, pH 7,2—9,0.
3. Сахароза — 0,25 М раствор, приготовленный на 100 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,5.
4. *L*-аспарагиновая кислота — 0,3 М раствор, нейтрализованный КОН до pH 7,0.
5. α -кетоглутаровая кислота — 50 мМ раствор, нейтрализованный КОН до pH 7,0.
6. НАДН — 3 мМ раствор (свежеприготовленный).
7. Малатдегидрогеназа — коммерческий препарат, разводят перед использованием 100 мМ К-фосфатным буфером, pH 7,5, до конечной концентрации 60 инт. ед./мл.
8. Щавелевоуксусная кислота — 30 мМ раствор, нейтрализованный КОН до pH 7,0.
9. Дигитонин — 2%-ный раствор, свежеприготовленный на 0,25 М сахарозе при нагревании.
10. KCl — 1 М раствор, приготовленный на 100 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,5.
11. Реактивы для определения белка микробиуретовым методом в присутствии 1%-ного дезоксихолата натрия.

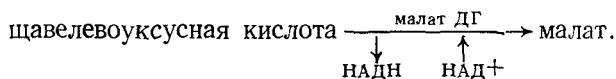
Получение растворимой клеточной фракции печени крысы. Все процедуры по получению препаратов аспартатаминотрансферазы проводят при 0°C.

Среда выделения: 0,25 М сахараза, рН 7,5

Навеску (5 г) тканевой кашицы (приготовление см. на с. 65) взвешивают и переносят в стеклянный стакан гомогенизатора Поттера. Добавляют среду выделения из расчета 9 мл среды на 1 г ткани и гомогенизируют в течение 30 с с помощью тефлонового пестика без нарезки. Полученный гомогенат центрифугируют при 20 000 g в течение 15 мин. Супернатант после центрифугирования представляет собой 10%-ную растворимую клеточную фракцию. Препарат фильтруют через 4 слоя марли и хранят порциями при -5°C в течение 2 нед. Размораживание растворимой клеточной фракции проводят при комнатной температуре. Перед определением активности аспартатаминотрансферазы препарат фермента разводят средой выделения до конечного разведения 1:100.

Получение митохондриальной фракции. Тканевый гомогенат центрифугируют при 600 g в течение 10 мин для удаления ядер и обломков клеток. Полученный супернатант фильтруют через 4 слоя марли и центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин. Полученный осадок митохондрий промывают средой выделения от примеси растворимой клеточной фракции. С этой целью осадок осторожно суспендируют с помощью пипетки в небольшом объеме среды выделения (митохондрии из 1 г ткани в 0,2 мл среды). Затем суспензию разводят средой выделения в 10 раз и центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин. Полученную фракцию промытых нативных митохондрий окончательно суспендируют в нужной среде из расчета: митохондрии из 1 г ткани в 5 мл среды. Фракцию нативных митохондрий (в 0,25 М сахаразе, рН 7,5) хранят при 0°C и используют в день выделения.

Определение активности аспартатаминотрансферазы. Активность фермента определяют энзиматическим методом по количеству образовавшейся щавелевоуксусной кислоты в процессе прямой аминотрансферазной реакции. Метод основан на использовании сопряженной малатдегидрогеназной реакции согласно схеме:



За ходом реакции следят на спектрофотометре по уменьшению оптической плотности при 340 нм в результате окисления НАДН. *Состав реакционной среды объемом 3 мл:* 100 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,5; L-аспартат 30 мМ; α-кетоглутарат 5 мМ; НАДН 0,1 мМ; малатдегидрогеназа 1 инт. ед.; препарат аспартатаминотрансферазы 25—100 мкл. Контрольная проба не содержит L-аспартат.

Реакцию начинают добавлением ферментного препарата. Показания прибора регистрируют каждые 30 с в течение 3 мин.

Расчет активности фермента проводят на основании величин начальной скорости реакции при условии наличия прямой пропорциональной зависимости скорости реакции от количества ферментного препарата в пробе. Активность фермента выражают в микромолях окисленного НАДН за 1 мин на 1 г ткани.

Определение активности малатдегидрогеназы митохондрий проводят согласно приведенной выше схеме.

Состав реакционной среды объемом 3 мл: 100 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,5; щавелевоуксусная кислота 3 мМ; НАДН 0,1 мМ; препарат митохондриального фермента: 25–200 мкл в пробе

Изучение свойств и локализации фермента

1. Определяют активность аспартатаминотрансферазы в растворимой клеточной фракции печени в день выделения и после хранения.

2. Определяют активность аспартатаминотрансферазы во фракции нативных митохондрий (в 0,25 М сахарозе) в день выделения.

3. Определяют активность аспартатаминотрансферазы во фракции митохондрий после разрушения мембран действием детергента дигитонина. С этой целью к суспензии нативных митохондрий, содержащей 4 мг белка в 1 мл добавляют 2%-ный раствор дигитонина из расчета 1 мг детергента к 1 мг белка. Суспензию инкубируют при 0°C в течение 10 мин. Действие детергента прекращают 5-кратным разведением 0,25 М сахарозой.

4. Эффективность действия детергента в отношении максимально полного выявления активности аспартатаминотрансферазы митохондрий сопоставляют с деструктивным действием на мембраны процедуры замораживания-оттаивания. С этой целью суспензию нативных митохондрий замораживают при температуре -20°C с последующим размораживанием при комнатной температуре.

5. Исследуют возможную локализацию аспартатаминотрансферазы в митохондриях печени:

а) *на наружной стороне внешней мембраны.* Обрабатывают митохондрии раствором высокой ионной силы с целью сольubilизировать фермент (перевести в растворенное состояние) с мембраны. Осадок нативных митохондрий суспендируют в 1 М KCl. После определения активности фермента в полученной суспензии ее центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин. Определяют активность фермента в осадке митохондрий, предварительно суспендировав его в 1 М KCl, и в супернатанте.

б) *в межмембранном пространстве.* Создают условия для гипоосмотического «шока» митохондрий. С этой целью осадок нативных митохондрий суспендируют в дистиллированной воде и центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин. Определяют активность фермента в супернатанте и в осадке митохондрий, предварительно суспендировав его в воде. Полученные данные сравнивают с величинами активности фермента в суспензии нативных митохондрий (в 0,25 М сахарозе) и после гипоосмотического «шока» (в воде).

в) *в матриксе.* Активность фермента определяют после деструктивного воздействия дигитонина на суспензию митохондрий, подвергнутых гипоосмотическому «шоку» (см. п. 3). Детергент используют в дозах 0,1–1 мг на 1 мг белка митохондрий.

Наряду с активностью аспартатаминотрансферазы в каждом случае определяют активность малатдегидрогеназы — маркерного фермента матрикса митохондрий.

При дозах детергента 0,3 и 0,5 мг на 1 мг белка митохондрий действие дигитонина исследуют также в присутствии 1 М KCl. В случае адсорбции фермента на внутренней мембране митохондрий под действием KCl возможна эффективная сольubilизация аспартатаминотрансферазы. Это можно установить, определив активность фермента в супернатанте после центрифугирования обработанной суспензии при 20 000 g в течение 20 мин.

6. Для фермента растворимой клеточной фракции и солюбилизованного из митохондрий исследуют профиль рН-зависимости активности в диапазоне изменений рН 6,5—9,0. Вследствие замены фосфатного буферного раствора трис-НСI буфером в области изменения рН 7,5—8,0 определение активности фермента проводят в обеих буферных системах. При интерпретации полученных данных делают поправку с учетом влияния состава буферной системы на активность фермента.

7. Для изоформ аспаратаминотрансферазы исследуют зависимость скорости реакции от концентрации *L*-аспартата: 1—10 мМ — для цитоплазматического и 0,1—1 мМ — для митохондриального изозима, а также от концентрации α -кетоглутарата: 0,2—2 мМ — для цитоплазматического и 0,3—3 мМ — для митохондриального изозима. В каждом случае субстрат, содержание которого не меняется, берется в насыщающей концентрации.

Графическими методами оценивают значения K_m по соответствующим субстратам.

ЛИТЕРАТУРА

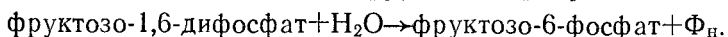
1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1982. Т. 1.
2. Диксон М., Уэбб Э. Биология ферментов//Ферменты. М., 1983. Т. 3. С. 887.
3. Яковлева В. И. Изоферменты//Усп. биол. хим. М., 1968. Т. 9. С. 55.
4. Уилкинсон Дж. Аспаратаминотрансфераза//Изоферменты. М., 1968. С. 143.
5. Катунума Н. Роль изоэнзимов трансаминаз в обмене веществ//Химия и биология пиридоксалевого катализа. М., 1968. С. 155.
6. Boyd J. W. The extraction and purification of two isoenzymes of *L*-aspartate-2-oxoglutarate aminotransferases//Biochim. Biophys. Acta. 1966. Vol. 113, N 2. P. 302.
7. Matlib M. A., O'Brien P. J. Compartmentation of enzymes in the rat liver mitochondrial matrix//Arch. Biochem. Biophys. 1975. Vol. 167, N 1. P. 192.

6. АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТАЗЫ

При изучении регуляции альтернативных метаболических путей, таких как гликолиз и глюконеогенез, большое значение придается ключевым реакциям, некоторые участники которых являются общими интермедиатами указанных метаболических путей. К числу таких химически различных альтернативных реакций относятся, например, фосфофруктокиназная и фруктозо-1,6-дифосфатазная реакции гликолиза и глюконеогенеза соответственно. Указанные реакции катализируют так называемый субстратный цикл обратимого превращения фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат, протекающего с затратой одной молекулы АТФ.

Скорость превращения веществ в альтернативных метаболических путях, а значит и их предпочтительная направленность решающим образом зависят от особенностей функционирования ферментов субстратного цикла. Для таких ферментов характерна, как правило, реципрокная регуляция с участием аллостерических эффекторов. В случае рассматриваемого субстратного цикла эффекторами являются АМФ — ингибитор фруктозо-1,6-дифосфатазы и активатор фосфофруктокиназы, а также цитрат-ион, являющийся активатором фруктозо-1,6-дифосфатазы и ингибитором фосфофруктокиназы.

Цель задачи заключается в изучении регуляторных свойств фруктозо-1,6-дифосфатазы печени крысы как фермента-участника субстратного цикла. Фруктозо-1,6-дифосфатаза (*D*-фруктозо-1,6-дифосфат-1-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.11) катализирует реакцию гидролиза фруктозо-1,6-дифосфата с образованием фруктозо-6-фосфата:



Фермент широко представлен в тканях с выраженным глюконеогенетическим превращением углеводов, т. е. в печени и почках. Фермент представляет собой тетрамер, для которого характерна кооперативность при взаимодействии с субстратом, ионом-активатором Mg и некоторыми внутриклеточными метаболитами.

Реактивы:

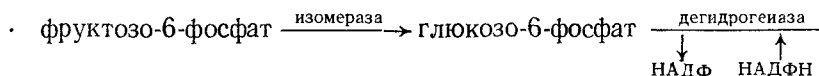
1. Трис-НСl буфер — 50 мМ раствор, рН 7,5, содержащий 1 мМ ЭДТА.
2. Трис-НСl буфер — 100 мМ раствор, рН 7,5, содержащий 0,02 мМ ЭДТА.
3. Фруктозо-1,6-дифосфат — 3 мМ раствор.
4. $MgCl_2$ — 150 мМ раствор.
5. KCl — 600 мМ раствор.
6. НАДФ — 7,5 мМ раствор.
7. Гексозо-6-фосфатизомеразы — коммерческий препарат (разводят перед использованием 100 мМ трис-НСl буфером, рН 7,5, до конечной концентрации 60 инт. ед./мл).
8. Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата — коммерческий препарат (разводят перед использованием 100 мМ трис-НСl буфером, рН 7,5, до конечной концентрации 60 инт. ед./мл).
9. АМФ — 15 мМ раствор.
10. ГМФ — 6 мМ раствор.
11. Аденин — 6 мМ раствор.
12. Калий фосфорнокислый — 30 мМ раствор.
13. Цитрат натрия — 100 мМ раствор.

Получение растворимой клеточной фракции печени крысы. Все процедуры по получению клеточной фракции проводят при 0°C.

Среда выделения: 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5, содержащий 1 мМ ЭДТА.

Тканевую кашицу (приготовление см. на с. 65) взвешивают и переносят в стакан гомогенизатора Поттера. Добавляют среду выделения из расчета 5 мл среды на 1 г ткани и гомогенизируют в течение 30 с с помощью тефлонового пестика без нарезки. Полученный гомогенат центрифугируют при 20 000 g в течение 15 мин. Супернатант представляет собой 16%-ную растворимую клеточную фракцию. Препарат фильтруют через 4 слоя марли и хранят порциями при -5°C в течение 2 нед. Размораживание растворимой клеточной фракции проводят при комнатной температуре.

Определение активности фруктозо-1,6-дифосфатазы. Активность фермента определяют энзиматическим методом по количеству образовавшегося фруктозо-6-фосфата. Метод основан на использовании системы двойного ферментного сопряжения с участием глюкозо-6-фосфатизомеразы и дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата согласно схеме:



За ходом реакции следят на спектрофотометре по увеличению оптической плотности при 340 нм в результате восстановления НАДФ.

Состав реакционной среды объемом 3 мл: 100 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5, содержащий 0,02 мМ ЭДТА; $MgCl_2$ 5 мМ; фруктозо-1,6-дифосфат — 100 мкМ; KCl — 100 мМ; НАДФ — 0,25 мМ; глюкозо-6-

фосфатизомеразы и дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата по 1 инт. ед. в пробе; растворимая клеточная фракция 25–100 мкл. Контрольная проба не содержит $MgCl_2$. Реакцию начинают добавлением ферментного препарата. Показания прибора регистрируют каждые 30 с в течение 3 мин.

Расчет активности фермента проводят на основании величин начальной скорости реакции при условии наличия прямой пропорциональной зависимости скорости реакции от количества ферментного препарата в пробе. Активность фермента выражают в микромолях восстановленного НАДФ за 1 мин на 1 г ткани.

Изучение регуляторных свойств фермента

1. Определяют активность фруктозо-1,6-дифосфатазы в свежевыделенной клеточной фракции и после хранения препарата при $-5^\circ C$.

2. Изучают зависимость скорости реакции от концентрации фруктозо-1,6-дифосфата в диапазоне концентраций субстрата $2 \cdot 10^{-5}$ – $3 \cdot 10^{-4}$ М. Отмечают факт субстратного торможения реакции при высоких концентрациях субстрата. Анализируя начальный участок графика зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, оценивают $S_{0,5}$ как значение концентрации фруктозо-1,6-дифосфата, при которой скорость реакции достигает половины максимальной величины.

Оценивают меру кооперативности при взаимодействии фермента с субстратом в низких концентрациях, исследуя полученную зависимость в координатах Силоновой—Курганова (с. 335) для случая, когда скорость реакции в отсутствие эффектора равна 0. Рассчитывают значение коэффициента кооперативности q по формуле:

$$q = \frac{\lg \left\{ \left(\frac{1}{v_1} - \frac{1}{v_2} \right) / \left(\frac{1}{v_2} - \frac{1}{v_3} \right) \right\}}{\lg \kappa},$$

где v_1 , v_2 , v_3 — скорости реакции при концентрации субстрата $S_1 < S_2 < S_3$.

3. Исследуют влияние АМФ на активность фруктозо-1,6-дифосфатазы в диапазоне концентраций эффектора от 10 до 100 мМ. Разностным методом Силоновой—Курганова оценивают степень кооперативности (q), проявляемую ферментом по данному ингибитору (с. 335).

В целях оценки специфичности ингибирующего действия АМФ на фермент исследуют влияние на активность фруктозодифосфатазы структурного аналога АМФ—ГМФ, а также структурных компонентов молекулы АМФ—аденина и Φ_n , взятых в концентрациях 100 мкМ и 1 мМ.

4. Изучают влияние аллостерического активатора Mg^{2+} на активность фруктозодифосфатазы в диапазоне концентраций $MgCl_2$ 0,1–8 мМ. С целью оценки меры кооперативности по активатору рассчитывают значение коэффициента кооперативности (q) методом Силоновой—Курганова (см. п. 2).

5. Исследуют возможность влияния цитрат-иона на активность фруктозодифосфатазы.

а. Активирующее влияние цитрата в отсутствие ионов Mg^{2+} (концентрация цитрата натрия — 1–10 мМ).

б. Действие цитрат-иона на активность фермента в составе Mg-цитратного комплекса. Подобного рода исследования требуют точного знания концентраций как Mg-цитратного комплекса, так и свободного Mg^{2+} , обладающего самостоятельным активирующим действием на фермент. Расчет соответствующих концентраций возможен с помощью системы уравнений:

$$\begin{cases} [Mg_{общ}^{2+}] = [Mg_{своб}^{2+}] + [Mg\text{-цитрат}]; & (1) \end{cases}$$

$$\begin{cases} [цитрат_{общ}] = [цитрат_{своб}] + [Mg\text{-цитрат}]; & (2) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \frac{[Mg_{своб}^{2+}] \cdot [цитрат_{своб}]}{[Mg\text{-цитрат}]} = K_d = 6 \cdot 10^{-4} \text{ М.} & (3) \end{cases}$$

Возможность самостоятельного активирующего действия Mg-цитратного комплекса дополнительно к максимальному действию Mg^{2+} проверяется в эксперименте, где в среде постоянно поддерживается концентрация свободного Mg^{2+} 3—7 мМ. Необходимые концентрации Mg-цитратного комплекса создаются внесением в среду соответствующих количеств $MgCl_2$ и цитрата натрия. Постановка эксперимента предполагает следующую последовательность действий: учитывая оптимальную концентрацию свободного Mg^{2+} и желаемую концентрацию Mg-цитратного комплекса, с помощью уравнения (1) рассчитывают необходимую концентрацию $Mg^{2+}_{общ}$, вносимого в виде $MgCl_2$. Затем с помощью уравнения (3) рассчитывают концентрацию цитрата_{своб}, после чего с помощью уравнения (2) рассчитывают концентрацию цитрата_{общ}, вносимого в виде цитрата натрия. Пример расчета: пусть концентрация $Mg^{2+}_{своб}$ составляет 7 мМ, желаемая концентрация Mg-цитрата — 1 мМ. Тогда вносимая концентрация $MgCl_2$ ($Mg^{2+}_{общ}$) составляет 8 мМ. При этом концентрация цитрата_{своб}, рассчитанная из уравнения (3), составляет 0,09 мМ. Следовательно, концентрация вносимого цитрата натрия (цитрат_{своб}) составляет 1,09 мМ.

С помощью аналогичных расчетов подбирают условия для создания в среде концентраций Mg-цитрата в диапазоне 0,1—3 мМ.

Возможность активирующего действия цитрата магния на активность фермента в условиях частичного проявления активирующего влияния Mg^{2+} проверяют в эксперименте, где постоянно поддерживается концентрация Mg^{2+} , при которой активность фермента проявляется не более чем на 40%. На фоне этой концентрации $Mg^{2+}_{своб}$ путем внесения в среду соответствующих количеств цитрата натрия и Mg^{2+} , а также $MgCl_2$ создаются условия для образования Mg-цитратного комплекса в диапазоне концентраций 0,1—1 мМ.

Обсуждается возможность взаимозаменяемости Mg^{2+} и Mg-цитратного комплекса как активирующих эффекторов фруктозо-1,6-дифосфатазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М., 1977.
2. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М., 1978.
3. Newsholme E. A. et al. The role of substrate cycles in metabolic regulation//Biochem. Soc. Transact. 1983. Vol. 11, N 1. P. 52.
4. Pogeil B. M. Regulation of fructose 1,6-diphosphatase (EDPase) and gluconeogenesis in rabbit liver and chick embryo cells//Mechanism of action and regulation of enzymes/Ed. T. Keleti. Budapest, 1975. Vol. 32. P. 237.
5. Datta A. J. et al. The activation of rabbit liver, muscle and kidney fructose-bisphosphatases by histidine and citrate//Arch. Biochem. Biophys. 1974. Vol. 165, N 2. P. 641.

6. Tashima I. et al. Control rabbit liver fructose 1,6-diphosphatase activity by magnesium ions//J. Biochem. 1975. Vol. 78, N 6. P. 1161.
7. Nellson K. et al. The effect of fructose 2,6-bisphosphate and AMP on the activity of phosphorylated and unphosphorylated fructose 1,6-bisphosphatase from rat liver//FEBS Lett. 1984. Vol. 167, N 2. P. 203.

II. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

1. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ СВОЙСТВ Са-АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Мембранные ферменты привлекают в настоящее время пристальное внимание, так как многие клеточные процессы протекают при их непосредственном участии.

Особое место среди них занимают ионные насосы (транспортные АТФазы) — белки, способные за счет энергии гидролиза АТФ переносить одно- и двухвалентные катионы (или анионы) через клеточные и внутриклеточные мембранные структуры против градиента концентрации. Так, Са-АТФаза саркоплазматического ретикулума (СР) регулирует процессы сокращения-расслабления в мышцах разных типов, аккумулируя Ca^{2+} из цитоплазмы внутрь СР.

Мембранные ферменты отличаются от растворимых ферментов одним важным свойством: все они прочно связаны с липидным бислоем соответствующих мембран. Поэтому помимо субстратов, активаторов или ингибиторов их регуляторами являются сами мембранные липиды. Белок-липидные взаимодействия играют важную роль в регуляции активности мембранных ферментов, причем действие многих биологически активных соединений реализуется через изменение структурного состояния липидного бислоя.

Удобным объектом для изучения свойств мембранных ферментов является Са-АТФаза (КФ 3.6.1.38) СР скелетных мышц кролика, поскольку содержание этого белка в легкой фракции мембран ретикулума достигает 80—90%; выделяемые препараты СР стабильны при хранении и имеют постоянный белковый и фосфолипидный состав. Цель работы — знакомство с методическими подходами к изучению взаимодействия мембранных ферментов с субстратами и регуляторами, к анализу конформационной подвижности мембранных белков, а также характера и роли белок-липидных взаимодействий в биологических мембранах.

Выделение препаратов легкой фракции саркоплазматического ретикулума из скелетных мышц кролика

Реактивы:

1. Раствор А — сахароза 0,3 М, гистидин 10 мМ, рН 7,7.
2. Раствор Б — КСl 0,6 М, бычий сывороточный альбумин — 0,6 мг/мл; гистидин 5 мМ, рН 7,2.
3. Раствор В (среда хранения) — сахароза 1 М, имидазол 25 мМ, рН 7,0 (5 мл).

Измельченную в мясорубке мышечную массу в количестве 100 г (получение см. с. 221) помещают в 4-кратный объем раствора А и гомогенизируют в ножевом гомогенизаторе (тип. 302, ПНР) 4 раза по 1 мин с одномоментными интервалами при 10 000 об/мин. Все операции проводят на холоде. Полученный гомогенат центрифугируют 20 мин

при 12 000 g, осадок отбрасывают. Супернатант фильтруют через 6 слоев марли и центрифугируют 60 мин при 45 000 g. Супернатант сливают, осадок суспендируют в растворе Б в гомогенизаторе Поттера (стекло, тефлон) до получения однородной суспензии. Полученную суспензию везикул инкубируют 60 мин при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при 0°С (обработка раствором высокой ионной силы необходима для экстракции актомиозинового комплекса), после чего центрифугируют 20 мин при 15 000 g. Осадок отбрасывают, супернатант центрифугируют 60 мин при 45 000 g. Полученный осадок, представляющий собой легкую фракцию везикул СР, суспендируют в растворе В до конечной концентрации 20—30 мг/мл. Выход белка СР составляет 1,5—2 мг/г ткани. Суспензию везикул разливают небольшими порциями по 0,3—0,5 мл в пластиковые пробирки и хранят при —20°С. В таком виде препараты СР хранятся в течение 2—3 мес без потери АТФазной активности.

Концентрацию белка определяют методом Лоури, растворяя везикулы СР в 1%-ном растворе дезоксихолата Na.

Получение ЭДТА-обработанных препаратов саркоплазматического ретикулума с высокой проницаемостью для кальция

Реактивы:

1. Раствор А — ЭДТА 1 мМ, KCl 100 мМ, MgCl₂ 0,1 мМ, гистидин 10 мМ, рН 8,5 при 0°С (50 мл).
2. Раствор Б (среда хранения) — сахароза 1 М, имидазол 25 мМ, рН 7,0 (5 мл).

Фрагменты СР, полученные методом дифференциального центрифугирования (см. выше), суспендируют в растворе А до конечной концентрации белка 0,5—1 мг/мл. Суспензию выдерживают в течение 60 мин на льду при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, после чего центрифугируют 60 мин при 45 000 g. Полученный осадок суспендируют в растворе Б до конечной концентрации белка 20—30 мг/мл. Аликвоты замораживают небольшими порциями по 0,3—0,5 мл в пластиковых пробирках. В таком виде препарат хранится при —20°С в течение 2—3 мес без потери активности.

Концентрацию белка определяют методом Лоури, растворяя везикулы в 1%-ном растворе дезоксихолата Na.

Определение АТФазной активности по нарастанию содержания в пробе Φ_n

Реактивы:

1. KCl — 1 М раствор.
2. MgCl₂ — 50 мМ раствор.
3. CaCl₂ — 5 мМ раствор.
4. ЭГТА — 5 мМ раствор.
5. Оксалат К — 50 мМ раствор.
6. АТФ — 30 мМ раствор.
7. Имидазол — 300 мМ раствор, рН 7,0.
8. Ацетатный буфер — 3 М раствор, рН 4,3.
9. Реактивы для определения неорганического фосфата по методу Ратбуна и Бетлах (с. 36).

Общую АТФазную активность ЭДТА-обработанных препаратов СР определяют по нарастанию Φ_n в среде инкубации, содержащей

100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ, 0,5 мМ CaCl₂, 0,5 мМ ЭДТА и 30 мМ имидазола, рН 7,0. Концентрация свободного Ca²⁺ в среде в таких условиях составляет ~10 мкМ, что достаточно для полной активации Са-АТФазы. Реакцию начинают добавлением в пробу объемом 1 мл 5—25 мкг белка СР (в зависимости от активности препарата). Время инкубации составляет 0,5—15 мин и подбирается с учетом линейности реакции во времени. Реакцию останавливают добавлением 1 мл охлажденного 3 М ацетатного буфера (рН 4,3) и определяют неорганический фосфат по методу Ратбуна и Бетлах (с. 36). Активность Mg-АТФазы определяют в той же среде в отсутствие добавки CaCl₂. Активность Са-АТФазы рассчитывают как разность между общей АТФазной активностью и активностью Mg-АТФазы. При работе с аккумулярующими Ca²⁺ препаратами СР в среду инкубации вводят 5 мМ оксалат калия для увеличения емкости везикул.

Определение количества SH-групп и изучение их кинетических характеристик с помощью 7-хлор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазола (НБД-хлорида)

Реактивы:

1. KCl — 1 М раствор.
2. ЭГТА — 5 мМ раствор.
3. Имидазол — 300 мМ раствор, рН 7,0.
4. НБД-хлорид — 50 мМ раствор в этиловом спирте, готовится непосредственно перед употреблением.

Реакцию модификации SH-групп Са-АТФазы препаратов ретикулума НБД-хлоридом проводят в среде следующего состава: 100 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 30 мМ имидазол (рН 7,0), белок СР 0,2—0,3 мг/мл, 0,75 мМ НБД-хлорид, что обеспечивает ~50-кратный избыток тиолового реагента по отношению к SH-группам белка. В контрольную пробу вносят все компоненты, за исключением белка СР. Реакцию начинают добавлением НБД-хлорида.

За ходом реакции следят, регистрируя увеличение оптической плотности при 420 нм — в максимуме поглощения S—НБД-производного (коэффициент молярной экстинкции для S—НБД-производного составляет $13 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$). В ходе реакции в некоторых условиях изменяется мутность суспензии СР, что приводит к увеличению светорассеивания. Для учета вклада светорассеивания в увеличение оптической плотности образца необходимо регистрировать оптическую плотность при другой длине волны, например при 550 или 600 нм, где не наблюдается поглощения S—НБД-производного. До начала реакции регистрируют оптическую плотность при 420 и 550 нм, после чего находят соотношение оптических плотностей при этих длинах волн. Известно, что величина светорассеивания зависит от длины волны, причем

$$\frac{E_1}{E_2} = \left(\frac{\lambda_2}{\lambda_1} \right)^n,$$

где E_1 и E_2 — величины оптической плотности при длинах волн λ_1 и λ_2 соответственно. Показатель степени n определяется свойствами везикул СР: их величиной, формой и т. д. Зная соотношение величин оптической плотности пробы при 420 и 550 нм до начала реакции и определив оптическую плотность при 550 нм в ходе реакции, можно рассчитать величину вклада светорассеивания в значение оптической плотности при 420 нм в любой момент времени. Вычитая из значения оптической плотности при 420 нм рассчитанное значение оптической

плотности, обеспечиваемое светорассеиванием, получают величину, характеризующую поглощение образующего S—НБД-производного

Значения оптической плотности регистрируют каждые 2—3 мин после начала реакции в течение 60—90 мин. Для работы желательнее использовать спектрофотометр, позволяющий работать в автоматическом режиме. Максимальную величину оптической плотности рассчитывают по формуле:

$$E_{\infty} = \frac{E_b^2 - E_a E_c}{2E_b - (E_a + E_c)},$$

где E_a , E_b и E_c — значения оптической плотности при 420 нм в моменты времени t_a , t_b , t_c соответственно, причем $t_b - t_a = t_c - t_b$, а $t_b - t_a$ примерно соответствует времени, за которое реакция протекает наполовину.

Поскольку в опытах используется большой избыток НБД-хлорида по отношению к SH-группам белка, процесс их модификации можно рассматривать как реакцию псевдопервого порядка, пренебрегая изменением концентрации НБД-хлорида в ходе реакции. При наличии более чем одного кинетического типа SH-групп в исследуемых препаратах скорость убыли непрореагировавших групп описывается следующим уравнением:

$$E_{\infty} - E_t = \sum (E_{\infty i} - E_{ti}) = \sum (E_{\infty i} e^{-k_i t}),$$

где E_{∞} и E_t — значения оптической плотности в конце реакции и в момент времени t соответственно; $E_{\infty i}$ и E_{ti} — значения оптической плотности в конце реакции и в момент времени t для каждого индивидуального кинетического типа SH-групп; k_i — константа скорости реакции псевдопервого порядка для модификации SH-групп этого кинетического типа.

Для определения числа типов SH-групп, их количества и кинетических характеристик строят график зависимости $\lg(E_{\infty} - E_t)$ от времени. Если получаемая зависимость нелинейна, то конечный линейный участок графика продолжают до пересечения с осью ординат и из величины отсекаемого на этой оси отрезка рассчитывают количество SH-групп данного, самого медленного типа. Константу скорости модификации SH-групп этого типа рассчитывают по формуле:

$$k_i = \frac{2,303}{t} \lg \frac{A_0}{A_t},$$

где $A_0 = E_{\infty}$, а $A_t = E_{\infty} - E_t$. Затем из экспериментальных точек на графике зависимости $\lg(E_{\infty} - E_t)$ от времени вычитают прямую, характеризующую модификацию самых медленных групп, и откладывают полученные значения на том же графике. Если полученная таким образом зависимость не является линейной, процедуру графического вычитания конечного линейного участка графика продолжают до тех пор, пока в результате вычитания на графике не получится прямая линия. Каждую прямую, характеризующую модификацию SH-групп определенного кинетического типа, анализируют описанным выше способом, рассчитывая количество SH-групп и константу скорости их модификации.

В препаратах СР в описанных выше условиях с помощью НБД-хлорида удается обычно выявить 8—10 молей SH-групп в расчете на 10^5 г белка, которые принадлежат к двум кинетическим типам. Ско-

рость модификации SH-групп данных типов различается примерно в 10 раз, что позволяет достаточно четко разделить их графически.

Исследование влияния субстратов АТФазной реакции и детергентов на кинетические характеристики SH-групп

Реактивы:

1. KCl — 1 М раствор.
2. ЭГТА — 10 мМ раствор.
3. Имидазол — 300 мМ раствор, pH 7,0.
4. АТФ (а также ЦТФ, ГТФ, УТФ, ИТФ) — 50 мМ раствор.
5. CaCl₂ — 10 мМ раствор.
6. MgCl₂ — 50 мМ раствор.
7. Тритон X-100 — раствор 10 мг/мл.
8. Додецилсульфат Na — раствор 10 мг/мл.
9. НБД-хлорид — 50 мМ раствор в этиловом спирте, готовится непосредственно перед употреблением.

Кинетические характеристики SH-групп белка и их изменение под влиянием различных воздействий позволяют анализировать изменения конформации белковой молекулы, которые происходят при связывании субстратов, ионов-активаторов, аллостерических модификаторов, детергентов, при изменении температуры и т. д.

При работе с мембранными препаратами Са—АТФазы СР целесообразно поставить следующие эксперименты:

а) проанализировать влияние (по сравнению с контролем) на кинетические параметры SH-групп Са—АТФазы ионов Ca²⁺ в концентрации от 0,5 до 1,0 мМ и ионов Mg²⁺ в концентрации от 1 до 10 мМ (состав среды инкубации контрольной пробы приведен выше);

б) проанализировать влияние на кинетические параметры SH-групп субстратов Са—АТФазы. СР: АТФ — в концентрации от 100 мкМ до 3 мМ и ГТФ, ЦТФ, УТФ, ИТФ — в концентрации 1—3 мМ; сравнить влияние разных субстратов на конформационное состояние Са—АТФазы; оценить влияние двухвалентных катионов на проявление эффекта субстратов, вводя в среду инкубации Ca²⁺ (до 1 мМ) или Mg²⁺ (до 3 мМ);

в) оценить влияние на конформационное состояние Са—АТФазы неионного детергента тритона X-100 в концентрациях 0,1—1 мг/мл и ионного детергента додецилсульфата Na в концентрациях 0,1—1 мг/мл; исследовать влияние двухвалентных катионов Ca²⁺ и Mg²⁺ и субстратов (АТФ, ГТФ и др.) на кинетические свойства SH-групп фермента в присутствии детергентов;

г) проанализировать влияние на кинетические параметры SH-групп изменения температуры в диапазоне от 10 до 45 °С.

Предлагаемая схема постановки эксперимента позволяет исследовать также влияние на конформационное состояние мембранного фермента Са—АТФазы различных мембранотропных соединений — локальных анестетиков, фармакологических агентов, органических растворителей и т. п.

Анализ инактивации Са—АТФазы ретикулума НБД-хлоридом и определение константы скорости инактивации фермента

Реактивы:

1. Реактивы для модификации SH-групп фермента НБД-хлоридом.

2. Реактивы для определения активности Са—АТФазы.
3. Реактивы для определения неорганического фосфата по методу Ратбуна и Бетлах (с. 36).

Для определения константы скорости инактивации Са—АТФазы НБД-хлоридом проводят модификацию SH-групп в той же среде, которая используется для определения кинетических характеристик SH-групп (с. 360). Реакцию начинают добавлением НБД-хлорида. По ходу реакции каждые 0,5—5 мин в зависимости от условий реакции отбирают аликвоты объемом 20—50 мкл и вносят их в 1 мл среды для определения активности Са—АТФазы (с. 359). Пробы инкубируют 1—2 мин при 25 или 37 °С, определив заранее линейность реакции во времени, после чего останавливают реакцию добавлением 1 мл 3 М ацетатного буфера (рН 4,3). Образующийся неорганический фосфат определяют методом Ратбуна и Бетлах (с. 36). Объем отбираемой пробы и время инкубации при определении активности подбирают заранее. Ингибирующим действием НБД-хлорида в ходе измерения активности фермента можно пренебречь, учитывая разведение ингибитора и высокую концентрацию АТФ в среде инкубации.

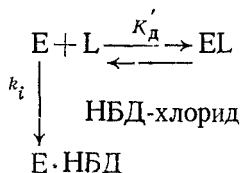
После определения активности строят график, отражающий зависимость скорости гидролиза АТФ от времени модификации препарата СР НБД-хлоридом, в полулогарифмических координатах. Если полученные экспериментальные точки лежат на одной прямой, реакцию инактивации можно считать реакцией псевдопервого порядка. Константу скорости инактивации рассчитывают так же, как константы скорости модификации SH-групп (с. 361).

При исследовании влияния различных веществ на скорость инактивации Са—АТФазы их вносят в среду для модификации SH-групп в нужных концентрациях (с. 360).

Поскольку препараты СР обладают не только Са-зависимой, но и Mg-зависимой АТФазной активностью, необходимо помимо общей АТФазной активности в соответствующие моменты времени определить Mg-зависимую АТФазную активность, которая измеряется в отсутствие добавки в среду инкубации СаCl₂. Активность Са-АТФазы рассчитывается как разность между общей и Mg-зависимой активностью.

Расчет значений кажущихся констант диссоциации для лигандов, обеспечивающих защиту Са—АТФазы от инактивации НБД-хлоридом

Измерение констант скорости инактивации Са—АТФазы НБД-хлоридом в присутствии разных концентраций лигандов (например, АТФ или АДФ) проводят, как описано выше. Расчет значений K'_d возможен по схеме реакции инактивации, согласно которой с ингибитором может взаимодействовать фермент, свободный от лиганда (схема справедлива в случае Са—АТФазы и НБД-хлорида);



Здесь E — Са—АТФаза, L — лиганд (АТФ или АДФ); K'_d — кажущаяся константа диссоциации комплекса фермент — лиганд (EL), а k_i — константа скорости инактивации фермента. Считая, что скорость образования комплекса EL значительно выше скорости инактивации фермента, убыль немодифицированной формы фермента можно описать следующим уравнением:

$$-\frac{dE}{dt} = k_i [E_{cs}] = \frac{k_i [E_{общ}]}{1 + \frac{[L]}{K'_d}}.$$

Так как количество немодифицированного фермента пропорционально его активности (A), уравнение можно преобразовать следующим образом:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{k_i (A)}{1 + \frac{[L]}{K'_d}} \quad \text{и} \quad -\frac{k_i}{1 + \frac{[L]}{K'_d}} = k'_i,$$

где k_i — константа скорости инактивации фермента в отсутствие лиганда, а k'_i — константа скорости инактивации фермента в присутствии лиганда в концентрации $[L]$. Таким образом, график зависимости $\lg(A)$ от времени в присутствии определенной концентрации лиганда $[L]$ представляет собой прямую с наклоном $k_i/(1 + [L]/K'_d)$, а значение K'_d можно определить по углу наклона прямой на графике зависимости k_i/k'_i от $[L]$. Более подробно вывод настоящего уравнения описан в статье А. М. Рубцова (см. с. 367, п. 5).

Исследование температурных зависимостей активности Са—АТФазы и Mg—АТФазы; расчет энергии активации

Реактивы:

реактивы для определения активности Са—АТФазы и Mg—АТФазы (с. 359).

Исследование температурных зависимостей мембранных ферментов позволяет в ряде случаев оценить влияние состояния липидной фазы мембран на их функционирование. Для этого измеряют активность ферментов при разных температурах, выражая полученные результаты в виде графика Аррениуса (график зависимости логарифма активности фермента от $1/T$). Вид получаемого графика (линейный или нелинейный с перегибом в определенной области температур) позволяет делать заключения о наличии термоиндуцированных изменений в функционировании фермента.

Для данной работы можно использовать прибор «Термоград-1», изготовленный на кафедре биохимии биологического факультета МГУ (описание прибора см. в работе (6) списка литературы). Прибор представляет собой дюралюминиевый блок с отверстиями для пробирок (16 рядов по 6 отверстий в каждом). При нагревании одного конца блока регулируемы нагревателями и охлаждении другого конца с помощью холодильного агрегата получают устойчивый градиент температур от 6 до 38 °С. Число проб, помещаемых в блок одновременно, достаточно для получения параллельных проб при каждой температуре и для контроля неферментативного расщепления субстрата за время реакции.

Для получения графика температурной зависимости активности Са—АТФазы определяют линейность ферментативной реакции во вре-

мени при низких, средних и высоких температурах и подопределении инкубации, исходя из полученных данных. Так как pH буферных растворов изменяется с изменением температуры, особое внимание обращается на контроль pH используемой среды инкубации. Определение активности Са—АТФазы целесообразно проводить во всем диапазоне температур одновременно.

При работе с препаратами СР рекомендуется поставить следующие эксперименты:

а) сравнить температурные характеристики Са- и Mg-зависимой АТФаз в координатах Аррениуса ($\lg A$ от $1/T$);

б) исследовать влияние детергентов (третон X-100, додецилсульфат Na в концентрациях 0,1—1 мг/мл) на температурную зависимость Са—АТФазы СР;

в) рассчитать энергию активации Са—АТФазы в области низких и высоких температур; энергия активации рассчитывается по формуле:

$$E_a = \frac{2,303R (\lg A_{T_2} - \lg A_{T_1})}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}},$$

где E_a — кажущаяся энергия активации; A_{T_1} — A_{T_2} — удельная активность фермента при температурах T_1 и T_2 ; R — универсальная газовая постоянная, равная 1,987 кал/моль·град.

Исследование температурных зависимостей флуоресценции меток и зондов, связанных с мембранами саркоплазматического ретикулума

Реактивы:

1. Сахароза — 1 М раствор.
2. ЭГТА — 10 мМ раствор.
3. Имидазол — 300 мМ раствор, pH 7,0, а также pH 7,5 и 8,0.
4. KCl — 1 М раствор.
5. CaCl_2 — 5 мМ раствор.
6. АТФ — 30 мМ раствор.
7. Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) — 100 мМ раствор в диметилформамиде, готовится непосредственно перед употреблением.
8. 1-Анилин-8-нафталин-сульфоновая кислота (АНС) — 5 мМ водный раствор.
9. Пирен — 10 мМ раствор в этиловом спирте.

Флуоресцентные зонды и метки являются удобным инструментом для исследования биологических мембран и мембранных ферментов. Использование зондов разной природы, способных связываться с белками или встраиваться в различные области липидного бислоя, а также меток, ковалентно реагирующих с функциональными группами белков или липидов, позволяет получить ценную информацию о состоянии и подвижности белка в мембране, состоянии липидного матрикса, характере белок-белковых и белок-липидных взаимодействий.

Для измерения флуоресценции используют специально предназначенные для этой цели флуоресцентные спектрофотометры, позволяющие с помощью монохроматоров задавать длины волн для возбуждающего и испускаемого света. Испускаемый флуорофором свет обычно регистрируют под углом 90° к падающему свету. В отсутствие флу-

спектрофотометра для работы можно использовать фотокolorиметр «Spekol-10» (ГДР) с приставкой для измерения флуоресценции. В этом случае длина волны возбуждающего света задается монохроматором прибора, а испускаемый свет проходит через специально подбираемый фильтр, который не пропускает возбуждающий свет, но пропускает испускаемый. Рекомендуемые в настоящей методике флуоресцентные зонды и метки обладают достаточно высоким квантовым выходом, что позволяет работать с ними на колориметре «Spekol-10».

ФИТЦ — флуоресцентная метка, ковалентно модифицирующая аминокруппы белка. Максимум возбуждения ФИТЦ — 490—495 нм, максимум флуоресценции — 525 нм. Обработку препаратов Са—АТФазы данной флуоресцентной меткой проводят в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 100 мкМ ЭГТА и 50 мМ имидазол (рН 8,0). В пробу объемом 5 мл вносят ФИТЦ до конечной концентрации 50 мкМ и белок СР до концентрации 2—3 мг/мл, после чего инкубируют 15 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. После инкубации пробу разводят раствором того же состава до объема 40 мл и центрифугируют 60 мин при 45 000 g. Полученный осадок суспендируют в среде, содержащей 100 мМ КСl, 100 мкМ ЭГТА и 50 мМ имидазол (рН 7,5), до концентрации белка 5—10 мг/мл. Измерение флуоресценции проводят в той же среде при концентрации белка в пробе объемом 3 мл 0,3—0,5 мг/мл.

После получения меченных ФИТЦ препаратов СР определяют количество включенной метки. Для этого измеряют оптическую плотность образца, содержащего модифицированный белок, при 490 нм и рассчитывают концентрацию ФИТЦ, используя коэффициент молярной экстинкции метки, равный $64 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Для учета вклада светорассеивания в качестве контроля используют раствор везикул СР той же концентрации по белку, но не обработанных ФИТЦ. После этого рассчитывают включение метки в белок Са—АТФазы, зная, что молекулярный вес фермента равен 100 000, а содержание белка Са—АТФазы в препаратах легкой фракции СР составляет ~80%. Для приведенных условий обработки включение метки составляет 1 моль/моль Са—АТФазы.

АНС — флуоресцентный зонд, нековалентно связывающийся с белками и неполярными областями мембран. При связывании АНС с белками или мембранами его флуоресценция значительно возрастает, так как квантовый выход флуоресценции АНС зависит от полярности его окружения и увеличивается в гидрофобных средах. Максимум возбуждения АНС — 360 нм, максимум флуоресценции — 460—480 нм (в зависимости от полярности микроокружения). При работе с препаратами СР измерение флуоресценции проводят в среде, содержащей 100 мМ КСl, 0,5 мМ ЭГТА и 50 мМ имидазол, рН 7,0. Концентрация белка СР в кювете — 0,3—0,5 мг/мл, концентрация АНС — от 5 до 75 мкМ (в зависимости от чувствительности прибора и поставленной задачи).

Пирен — гидрофобный флуоресцентный зонд, способный встраиваться в неполярные области между жирнокислотными цепями фосфолипидов бислоя мембран. При этом в спектре флуоресценции пирена, встроенного в мембрану, обнаруживаются 3 пика (в области 370—390 нм), характерные для мономерной формы пирена, и один пик (в области 460—470 нм), характерный для эксимера пирена — димера, состоящего из одной возбужденной и одной невозбужденной молекулы зонда. Максимум возбуждения пирена — 330—335 нм. Величина пика флуоресценции эксимера характеризует способность молекул зонда

взаимодействовать друг с другом в гидрофобной сердцевине мембраны, что определяется двумя взаимосвязанными факторами — плотностью упаковки углеводородных цепей липидов и гидрофобным объемом мембраны. Обычно исследуется степень эксимеризации пирена, т. е. соотношение интенсивной флуоресценции эксимерной и мономерной форм зонда, которое характеризует микровязкость гидрофобных областей мембраны. При работе на фотоколориметре «Spekol-10» удается регистрировать только флуоресценцию эксимерной формы пирена, однако при наличии соответствующих светофильтров можно попытаться выделить по отдельности пики мономерной и эксимерной форм. При работе с препаратами СР флуоресценцию пирена измеряют в среде, содержащей 100 мМ KCl, 0,5 мМ ЭГТА, 50 мМ имидазола, pH 7,5, 0,25 мг/мл белка СР и 25 мкМ пирена. После добавления пирена пробу инкубируют 5—10 мин для более полного встраивания зонда в мембрану.

Температурную зависимость флуоресценции меток и зондов измеряют в приборах с термостатируемым кюветным отделением, изменяя температуру от 5 до 40°С со скоростью 2—3°С в мин. В отсутствие приборов такого класса можно инкубировать пробы непосредственно в кюветах, термостате, а измерение флуоресценции проводить по возможности быстро, в течение 1—1,5 мин.

При работе с препаратами СР рекомендуется выполнить следующие задачи:

а) определить параметры связывания АНС с мембранами СР в разных условиях. Для этого в пробу, содержащую все необходимые компоненты и белок, вносят АНС небольшими порциями так, чтобы его концентрация изменялась от 5 до 75 мкМ; после каждой добавки АНС измеряют интенсивность флуоресценции и после окончания эксперимента строят график зависимости $1/F$, где F — интенсивность флуоресценции, от $1/[АНС]$; с помощью данного графика рассчитывают максимальную флуоресценцию и кажущееся значение K'_d для АНС; исследуют влияние pH (от 6,0 до 8,0), ионов Ca^{2+} (0,5—1,0 мМ), Mg^{2+} (1—10 мМ), АТФ (3 мМ) на значение K'_d и максимальной флуоресценции АНС;

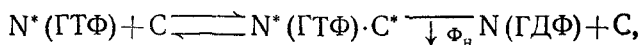
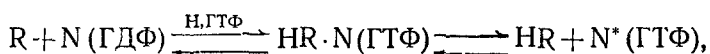
б) исследовать температурную зависимость флуоресценции ФИТЦ, АНС и пирена в мембранах СР, регистрируя точки перегибов на графиках Аррениуса для флуоресценции ($\lg F$ от $1/T$); сравнить положения точек перегибов на графиках Аррениуса для флуоресцентных меток и зондов с положением точки перегиба на графике Аррениуса для Са—АТФазной активности; исследовать влияние АТФ (3 мМ), ионов Ca^{2+} (0,5—1,0 мМ) и Mg^{2+} (1,0—10,0 мМ) на температурные зависимости флуоресценции ФИТЦ, АНС и пирена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Транспортные аденозинтрифосфатазы. Современные методы исследования/Под ред. А. А. Болдырева. М., 1977.
2. Болдырев А. А., Лопина О. Д., Рубцов А. М. и др. Биохимия активного транспорта ионов и транспортные АТФазы. М., 1983.
3. Лаквич Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
4. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
5. Рубцов А. М. Влияние субстратов Са—АТФазы на кинетические свойства SH-группы саркоплазматического ретикулаума//Биохимия, 1982. Т. 47, № 6. С. 1046.
6. Бессонов В. А., Болдырев А. А., Ко Чже Чжун и др. Na, K-АТФаза: температурная зависимость активности при гидролизе разных субстратов//Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол. 1977. № 4. С. 17.

2. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АКТИВАЦИИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ⁴

Аденилатциклаза (КФ 4.6.1.1) эукариот является ферментом плазматических мембран. Она катализирует реакцию образования цАМФ из АТФ. Фермент состоит из трех компонентов: рецептора к гормону, ГТФ-связывающего белка (N-белка) и каталитической субъединицы. Гормональная активация аденилатциклазы осуществляется в результате следующих взаимодействий компонентов. Гормон, связываясь с рецептором, индуцирует образование тройного комплекса: гормон — рецептор — N-белок. Связывание ГТФ с N-белком вызывает диссоциацию тройного комплекса с образованием активированного N-белка. Активированный N-белок, содержащий ГТФ, взаимодействует с каталитической субъединицей фермента, увеличивая ее активность. Гидролиз ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата ГТФазой N-белка приводит к диссоциации комплекса N-белка с каталитической субъединицей и «выключению» фермента:



где Н — гормон, R — рецептор к гормону, N, N* — неактивная и активированная формы N-белка, С, С* — неактивная и активная каталитические субъединицы аденилатциклазы.

Таким образом, измеряемая активность аденилатциклазы зависит от скорости активации N-белка и скорости гидролиза ГТФ.

Целью работы является изучение процесса активации аденилатциклазы из печени крысы гормонами и гуаниловыми нуклеотидами.

Реактивы:

1. Среда выделения: 10 мМ трис—HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 1мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 0,25 М сахароза.
2. Среда выделения без сахарозы.
3. Трис-HCl — 500 мМ раствор, pH 7,5, содержащий 1 мМ цАМФ.
4. MgCl₂ — 50 мМ раствор.
5. АТФ — 1 мМ раствор, содержащий 10 мМ дитиотреитол.
6. Креатинфосфат — 100 мМ раствор, содержащий 4 мг/мл креатинфосфокиназы.
7. Имидазол — 1,5 М раствор.
8. Гуанилилимидодифосфат — 1 мМ раствор.
9. Изопротеренол — 1 мМ раствор.
10. Среда R (общий объем 25 мкл, готовить непосредственно перед определением активности): по 5 мкл растворов (3) — (6), [α —³²P] АТФ (500 000 имп/мин).

Получение мембранного препарата аденилатциклазы. Кашицу печеночной ткани (приготовление см. на с. 65) в количестве 100 г помещают в гомогенизатор MPW302, добавляют 90 мл среды выделения и гомогенизируют в течение 3 мин при максимальной скорости. Стакан гомогенизатора охлаждают во льду. Гомогенат фильтруют через 2 слоя марли и центрифугируют 10 мин при 500 g. Осадок отбрасывают, супернатант центрифугируют 20 мин при 10 000 g. Полученный осадок суспендируют в 90 мл среды выделения, не содержащей сахарозы, и

⁴ Работа предложена Скуратором А. В.

центрифугируют так же. Полученную фракцию клеточных мембран суспендируют в среде выделения без сахарозы и $MgCl_2$ до концентрации белка 4 мг/мл.

Определение активности аденилатциклазы. Реакцию начинают внесением в среду R (объема 25 мкл) препарата аденилатциклазы, содержащего 40—80 мкг белка, и измеряют количество цАМФ в объеме 50 мкл, образующегося при 30 °С. Реакцию останавливают добавлением 200 мкл 0,5 н. HCl. Пробирки кипятят на водяной бане в течение 6 мин и сразу после этого нейтрализуют содержимое 200 мкл 1,5 М имидазола.

В условиях мягкого кислотного гидролиза цАМФ не разрушается, тогда как АТФ теряет фосфатную часть молекулы, и вся радиоактивность $[\alpha-^{32}P]$ АТФ, не включенная в цАМФ, переводится в неорганический фосфат. Это позволяет отделить цАМФ от фосфата путем избирательной сорбции фосфата на окиси алюминия.

Содержимое пробирок (450 мкл) наносят на стеклянные колонки размером 1×6 см, заполненные 1 г сухой окиси алюминия. цАМФ элюируют пятью миллилитрами воды в сцинтилляционные флаконы. Счет радиоактивности проводят по Черенкову на жидкостно-сцинтилляционном счетчике в тритиевом канале.

Изучение регуляции аденилатциклазы гормонами и гуаниловыми нуклеотидами. При изучении влияния гуаниловых нуклеотидов и катехоламинов на активность аденилатциклазы (АЦ) реакцию проводят в пробах объемом 50 мкл. Для определения зависимости активности фермента от концентрации гуанилилимидодифосфата (ГИДФ) в пробирки вносят по 20 мкл смеси R, 5 мкл воды и 5 мкл ГИДФ (10^{-7} — 10^{-4} М). Реакцию начинают внесением препарата плазматических мембран объемом 20 мкл и ведут в течение 20 мин. Определение активности АЦ в присутствии катехоламинов и гуаниловых нуклеотидов проводят также в объеме 50 мкл, смешивая 20 мкл смеси R, 5 мкл изопротеренола (10^{-5} М) и 5 мкл ГИДФ (10^{-7} — 10^{-4} М). Реакцию начинают внесением препарата белка и проводят в течение 30 мин. Строят графики зависимости активности фермента от концентрации ГИДФ. Из полученных графиков определяют кажущиеся константы активации.

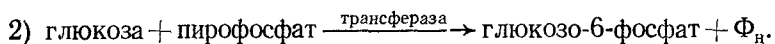
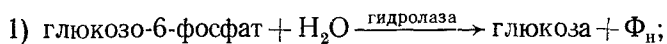
Для изучения скорости активации АЦ проводят реакцию в пробах объемом 50 мкл в течение различных промежутков времени (0—40 мин). Инкубацию проводят в аналогичных условиях в присутствии ГИДФ (10^{-5} М). Для изучения влияния катехоламинов на активацию АЦ в соответствующие пробы вносят ГИДФ (10^{-5} М) и изопротеренол (10^{-5} М). Гуаниловые нуклеотиды активируют фермент медленно, что приводит к появлению лаг-фазы на графике временной зависимости образования продукта реакции. Изопротеренол увеличивает скорость активации фермента, что приводит к уменьшению лаг-фазы. Ее длительность определяют по пересечению линейного участка графика временной зависимости образования продукта с осью абсцисс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воейков В. Л. Сопряжение рецепторов гормонов и нейромедиаторов с аденилатциклазой//Итоги науки и техники. Сер. биоорганическая химия/Под ред. Ю. А. Овчинникова. М., 1984. Т. 2. С. 172.
2. Ткачук В. А., Авдонин П. В. Изучение механизмов активации аденилатциклазы сердца адреналином и ионами фтора//Биохимия. 1977. Т. 42, № 11. С. 2005.
3. Counis R., Mongongu S. Adenylate cyclase assay with $\gamma-^{32}P$ ATP as substrate//Anal. Biochem. 1978. Vol. 84, N 1. P. 179.
4. Рогинский С. З., Шноль С. Э. Изотопы в биохимии. М., 1963.

3. МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДЕТЕРГЕНТОВ

Глюкозо-6-фосфатаза (*D*-глюкозо-6-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.9) является терминальным ферментом глюконеогенеза. Фермент мультифункционален, поскольку способен не только катализировать гидролиз глюкозо-6-фосфата и других фосфорсодержащих соединений, но и осуществлять синтез глюкозо-6-фосфата из глюкозы, используя в качестве донора фосфатной группы целый ряд метаболитов, физиологически важными из которых являются пирофосфат и карбамоилфосфат:



В связи с этим уникальным свойством фермента в настоящее время обсуждается его физиологическая роль в системе, регулирующей уровень сахара крови. Фермент высокоактивен в печени и почках млекопитающих. Основное место локализации в клетке — микросомальные мембраны.

Глюкозо-6-фосфатаза — интегральный белок микросомальных мембран. Активный центр фермента обращен внутрь везикул, поэтому для полного выявления его активности и изучения кинетических свойств необходима обработка мембранного препарата поверхностноактивными веществами — детергентами. Детергенты представляют собой специальную группу липидов, относящихся к классу растворимых амфифильных соединений, т. е. соединений, имеющих в своей структуре как гидрофильные, так и гидрофобные участки. В зависимости от пространственной структуры, соотношения гидрофильной и гидрофобной зон, наличия заряженных групп детергенты обладают различным характером действия на биологические мембраны: от мягкого, вызывающего лишь дезориентацию структурных компонентов мембран, до значительно выраженной их солюбилизации и растворения мембран.

В зависимости от целей эксперимента в каждом конкретном случае выбирается не только определенный тип детергента, но также подбираются оптимальные условия его действия в отношении мембранного фермента (концентрация, время и температура обработки, количество мембранного материала). При выборе оптимально действующей концентрации детергентов следует помнить, что в определенных условиях они склонны к образованию агрегатов — мицелл, эффективность действия которых отличается от эффективности мономерных форм детергентов. Концентрация, выше которой происходит образование мицеллярной формы детергентов, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). Так, для неионного детергента тритона X-100 ($m.m. = 643 \text{ Да}$) и анионного детергента дезоксихолата натрия ($m.m. = 420 \text{ Да}$) величины ККМ соответственно равны 0,24 и 5 мМ.

В задачу работы входит знакомство с особенностями ферментных препаратов, являющихся интегральными компонентами мембран, а также изучение гидролазной и трансферазной активности глюкозо-6-фосфатазы микросомальных мембран печени крысы с целью оценить реальность их участия в механизме регуляции уровня сахара крови.

Реактивы:

1. Сахароза — 0,25 М раствор.
2. Малеатный буфер — 100 мМ раствор, pH 6,5.

3. трис-НСI буфер — 50 мМ раствор, рН 7,5; 150 мМ раствор, рН 8,0.
4. Глюкозо-6-фосфат — 20 мМ раствор на малеатном буфере, рН 6,5.
5. Глюкоза — 0,54 М раствор на малеатном буфере, рН 6,5.
6. Пирофосфат натрия — 150 мМ раствор на малеатном буфере, рН 6,5.
7. Реактивы для определения Φ_n методом Фиске—Суббароу или Самнера.
8. НАДФ — 6 мМ раствор.
9. Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата — коммерческий препарат (разводят перед использованием 50 мМ трис-НСI буфером до конечной концентрации 60 инт. ед./мл).
10. Дезоксихолат натрия — 2%-ный раствор.
11. Тритон X-100 — 2%-ный раствор.
12. Трихлоруксусная кислота — 10%-ный раствор.
13. Реактивы для определения белка микробиуретовым методом в присутствии 1%-ного раствора дезоксихолата натрия на 1н. NaOH.
14. CaCl_2 — 80 М раствор.

Получение препарата микросом из печени крысы. Все операции по получению мембранных препаратов проводят при 0 °С.

Среда выделения: 0,25 М сахароза.

а. Метод высокоскоростного центрифугирования. Кашицу (~5 г) охлажденной печеночной ткани (см. с. 65) взвешивают, помещают в стакан гомогенизатора Поттера и гомогенизируют в 5 объемах среды (по отношению к весу ткани) в течение 1 мин, используя тefлоновый пестик без нарезки. После гомогенизирования разведение доводят до 1:14. Гомогенат центрифугируют при 15 000 g в течение 10 мин для осаждения ядер, обломков клеток и митохондрий. Полученный супернатант фильтруют через 4 слоя марли. Для осаждения микросомальной фракции супернатант центрифугируют при 100 000 g в течение 1 ч или при 40 000 g в течение 2 ч. Осадок микросом отмывают средой выделения от примеси растворимой клеточной фракции. С этой целью его суспендируют с помощью пипетки в небольшом объеме среды выделения (микросомы из 1 г ткани в 0,2 мл среды), затем объем суспензии разводят в 20 раз и центрифугируют в указанных выше условиях. Полученную фракцию промытых микросом окончательно суспендируют в среде выделения из расчета: микросомы из 1 г ткани в 1 мл среды. Препарат хранят порциями при —20 °С в течение 2 нед. Размораживание препарата проводят при комнатной температуре.

б. Метод низкоскоростного центрифугирования (Са-микросомы). Метод основан на взаимодействии бивалентных катионов (Ca^{2+}) с отрицательно заряженной поверхностью микросомальных мембран. В результате снятия заряда отдельные частицы микросом слипаются, образуя агрегаты большого размера, которые осаждаются при относительно низких скоростях центрифугирования.

В полученном постмитохондриальном супернатанте доводят рН до 7,5 с помощью 150 мМ трис-НСI буфера, рН 8,0. К супернатанту добавляют CaCl_2 до конечной концентрации 8 мМ. Через 5 мин инкубации на холоде при помешивании супернатант центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин. Полученный осадок микросом промывают 150 мМ трис-НСI буфером, рН 8,0 (см. п. а) и окончательно суспендируют в

0,25 м сахарозе из расчета, микросомы из 1 г ткани в 1 мл среды. Препарат хранят при -20°C в течение 2 нед. Белок в препаратах микросом определяют микробиуретовым методом в присутствии 1%-ного дезоксихолата натрия (с. 81).

Активация глюкозо-6-фосфатазы детергентами. Процедура активации фермента в мембранных препаратах проводится при 0°C под действием тритона X-100 или дезоксихолата натрия. К 0,9 мл суспензии микросом (примерно 20 мг белка) добавляют 0,1 мл детергента до необходимой концентрации. Через 10 мин инкубации при помешивании действие детергентов прекращают пятикратным разведением суспензии 0,25 М сахарозой. Обработку микросом детергентами проводят непосредственно перед началом экспериментов.

Определение активности глюкозо-6-фосфатазы. а. Гидролазная активность по отношению к глюкозо-6-фосфату. Активность фермента определяют по количеству образовавшегося в ходе реакции F_H .

Состав реакционной среды объемом 1,5 мл: малеатный буфер — 100 мМ; pH 6,5, глюкозо-6-фосфат — 20 мМ, ферментный препарат — 0,1—0,3 мл в пробе.

Контрольная проба не содержит глюкозо-6-фосфат. Реакцию начинают добавлением ферментного препарата при 30°C . После 10-минутной инкубации реакцию останавливают добавлением 1 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Пробы охлаждают до 0°C , выпавший осадок денатурированного белка отделяют центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. В полученных супернатантах pH доводят до 7,0 (конечный объем пробы 3 мл) и определяют содержание F_H методом Фiske—Суббароу или Самнера, используя аликвоты супернатанта объемом 0,5—1 мл (с. 34, 35).

б. Трансферазная активность с пирогосфатом натрия. Активность фермента определяют по количеству образовавшегося в ходе реакции глюкозо-6-фосфата.

Состав реакционной среды объемом 1,5 мл: малеатный буфер — 100 мМ, pH 6,5, глюкоза — 0,18 М, пирогосфат натрия — 20 мМ, pH 6,5, ферментный препарат—0,1—0,3 мл в пробе.

Условия инкубации те же, что и в случае определения гидролазной активности. Реакцию останавливают нагреванием проб в кипящей водяной бане. Осадок денатурированного белка отделяют центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин.

Определение в супернатанте глюкозо-6-фосфата проводят энзиматическим методом в системе с дегидрогеназой глюкозо-6-фосфата согласно схеме (с. 41). За ходом реакции следят на спектрофотометре по увеличению оптической плотности при 340 нм в результате восстановления НАДФ. Показания прибора регистрируют после доведения реакции до конца.

Состав реакционной среды объемом 3 мл: трис-HCl буфер 50 мМ, pH 7,5; НАДФ — 1 мМ, дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата — 1 инт. ед. в пробе, супернатант, содержащий глюкозо-6-фосфат, — 0,5—1 мл.

Расчет активности фермента во всех случаях проводят на основании величин начальной скорости реакции при условии наличия прямой пропорциональной зависимости скорости реакции от количества ферментного препарата в пробе. Скорость фермента выражают в микромолях превращенных субстратов за 1 мин на 1 мг микросомального белка или на 1 г ткани.

изучение свойств фермента

1. В полученных разными методами препаратах микросом определяют содержание белка, учитывая, что теоретический выход препаратов по белку составляет 20—30 мг на 1 г ткани.

2. Определяют гидролазную активность фермента в полученных разными методами препаратах микросом в день выделения и после хранения. Перед определением активности фермента в неактивированных мембранных препаратах суспензию микросом разводят сахарозой в 5 раз.

В дальнейшей работе используют препараты микросом, полученные методом низкоскоростного центрифугирования (Са-микросомы).

3. Исследуют влияние детергентов — тритона X-100 и дезоксихолата натрия — на гидролазную активность глюкозо-6-фосфатазы. Для активации фермента используют детергенты в концентрациях 0,01—0,5%; время инкубации — 1—10 мин. Дальнейшую работу проводят с активированными препаратами микросом в оптимальных условиях (химическая природа и концентрация детергента; температура и время его действия).

4. Определяют трансферазную активность глюкозо-6-фосфатазы по схеме, представленной в пп. 2 и 3.

5. Используя активированные препараты микросом, исследуют зависимость скорости гидролазной и трансферазной реакций от концентрации соответствующих субстратов: глюкозо-6-фосфата 1—20 мМ, глюкозы — 40—200 мМ, пирогосфата — 1—20 мМ. Рассчитывают значения K_m по субстратам, используя различные графические методы.

6. Исследуют влияние 40 и 90 мМ глюкозы на скорость гидролазной реакции в диапазоне концентраций глюкозо-6-фосфата 1—6 мМ. Рассчитывают значение K_i по ингибитору.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М., 1977.
2. Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. М., 1979.
3. Nordle R. C. Glucose-6-phosphatase-phosphotransferase: Roles and regulation in relation to gluconeogenesis//Gluconeogenesis; its regulation in mammalian species. N. Y.; L., 1976. P. 93.
4. Nordle R. C. et al. Biological regulation of liver microsomal glucose-6-phosphatase//J. Biol. Chem. 1968. Vol. 243, N. 6. P. 1140.
5. Nordle R. C. Multifunctional glucose-6-phosphatase: cellular biology//Life Sci. 1979. Vol. 24, N 26. P. 2397.
6. Helenius A., Simons K. Solubilization of membranes by detergents//Biochim. Biophys. Acta. 1975. Vol. 415, N 1. P. 29.
7. Nordle R. C. Fine tuning of blood glucose concentrations//Trends Biochem. Soc. 1985. Vol. 10, N 2. P. 70.

4. ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ГЕКСОКИНАЗЫ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С МЕМБРАНАМИ

При решении вопросов об особенностях функционирования и регуляции активности ферментов *in vivo* существенно важным следует считать влияние внутриклеточных структур, например мембран, на характер проявления каталитических свойств ферментов. Для целого ряда ферментов установлена способность к изменению внутриклеточной локализации вследствие существования динамического равновесия между связанной с мембранами и свободной формами ферментов. В результате нековалентной адсорбции на мембране возможны конформационные изменения ферментов, сопровождающиеся модификацией кинетических свойств, а следовательно, и каталитической эффективности.

Указанные положения составляют основу современной концепции адсорбционного механизма регуляции активности ферментов в клетке, в том числе и гексокиназы тканей млекопитающих.

Гексокиназа (АТФ: *D*-гексозо-6-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1) катализирует реакцию трансфосфорилирования между $Mg-ATP$ и гексозами с образованием фосфорных эфиров гексоз и $Mg-ADP$:



Открывая первый этап в метаболизме глюкозы — ее фосфорилирование, гексокиназная реакция занимает ключевое положение по отношению к важнейшим путям обмена углеводов: гликолизу, биосинтезу гликогена и пентозофосфатному пути. Реализация функции ключевого фермента во многом зависит от способности гексокиназы к взаимодействию с митохондриальными мембранами.

Адсорбционный механизм регуляции активности гексокиназы скелетной мышцы (II изотим гексокиназы) реализуется в повышении каталитической эффективности фермента вследствие нековалентной иммобилизации на митохондриальных мембранах. Связанная форма фермента по сравнению со свободной обладает большим числом оборотов, повышенным сродством к субстрату глюкозе и менее чувствительна к ингибирующему действию продукта реакции глюкозо-6-фосфата. Связь фермента с наружной митохондриальной мембраной осуществляется преимущественно с участием фосфолипидного компонента мембран и регулируется внутриклеточными метаболитами. Так, Mg^{2+} и глюкоза являются адсорбирующими фермент реагентами, АТФ и глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) солибилизируют фермент, контролируя тем самым соотношение разных по каталитической эффективности форм фермента.

В задаче исследуется взаимодействие изотима II гексокиназы скелетных мышц крысы с искусственной фосфолипидной мембраной (лецитиновые липосомы), имитирующее поведение фермента при иммобилизации на биологической мембране.

Реактивы:

1. К-фосфатный буфер — 10 мМ раствор, pH 7,0.
2. Трис-НСI буфер — 50 мМ раствор, pH 7,8.
3. KCl — 200 мМ раствор, приготовленный на 10 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,0.
4. Суспензия ДЭАЭ-целлюлозы, уравновешенная 10 мМ К-фосфатным буфером, pH 7,0.
5. Сульфат аммония (перекристаллизован с ЭДТА).
6. $MgCl_2$ — 0,5 М раствор.
7. Яичный лецитин.
8. Холат натрия.
9. Глюкоза — 90 мМ раствор.
10. АТФ — 240 мМ раствор.
11. НАДФ — 7,5 мМ раствор.
12. Дегидрогеназа Г-6-Ф — коммерческий препарат (разводят перед использованием 50 мМ трис-НСI буфером, pH 7,8, до конечной концентрации 60 инт. ед./мл).
13. Реактивы для определения белка микробиуретовым методом в присутствии 1%-ного дезоксихолата натрия.
14. Дитиотреитол.

Получение растворимой клеточной фракции скелетных мышц крысы. Все процедуры по получению препаратов гексокиназы проводят при 0°C.

Среда выделения: 10 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,0.

Навеску (~5 г) измельченной мышечной ткани (получение см. на с. 49) гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком с нарезкой. Тканевый гомогенат после 20-минутной инкубации при помешивании центрифугируют при 15 000 *g* в течение 20 мин. Супернатант после центрифугирования представляет собой 14%-ную растворимую клеточную фракцию. Препарат фильтруют через 4 слоя марли и хранят при 0 °С в течение суток.

Получение препарата II изозима гексокиназы. К растворимой клеточной фракции добавляют при помешивании суспензию ДЭАЭ-целлюлозы из расчета: 1 мл фракции — 5—10 мг сухой ДЭАЭ-целлюлозы. После 10-минутной инкубации суспензию фильтруют с помощью водоструйного насоса на воронке Бюхнера. Осадок ДЭАЭ-целлюлозы с адсорбированной гексокиназой промывают К-фосфатным буфером, содержащим 40 мМ KCl (объем равен половине исходного объема растворимой клеточной фракции). Затем гексокиназу элюируют 200 мМ KCl, приготовленным на К-фосфатном буфере. В целях концентрирования препарата гексокиназы объем элюирующего раствора уменьшен в 3 раза по отношению к исходному объему растворимой клеточной фракции. После 10-минутной инкубации элюат отделяют на воронке Бюхнера.

К полученному элюату добавляют дитиотреитол до конечной концентрации 1 мМ и сухой сульфат аммония до 50%-ного конечного насыщения. После 20-минутного перемешивания осадок белка отделяют центрифугированием при 12 000 *g* в течение 10 мин и растворяют в небольшом объеме 50 мМ трис-HCl буфера, pH 7,8, содержащего 1 мМ дитиотреитол. Препарат фермента можно хранить в виде сульфатаммонийного осадка при 0 °С в течение нескольких дней.

Получение препарата лецитиновых липосом. а. Метод быстрого удаления детергента. Препарат яичного лецитина осаждают на роторном испарителе от органического растворителя и растворяют в холате натрия, приготовленном на 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7,8, в молярном соотношении фосфолипид—детергент, равном 2:1 (м. м. лецитина — 800 Да, м. м. холата — 450 Да). Для удаления детергента раствор лецитина пропускают дважды через колонку с анионитом «Dowex 1×4» (20—50 меш), уравновешенную 50 мМ трис-HCl буфером, pH 7,8. Размеры колонки в случае использования 50 мг лецитина составляют 1×7 см. Выход липосом с колонки регистрируют по мутности вытекающего раствора, содержащего везикулы.

б. Метод быстрого этанольного разведения. Этанольный раствор лецитина, содержащий 20—40 мкмоль фосфолипида, быстро вводится с помощью шприца в 0,16 М раствор KCl до максимальной концентрации этанола — 7,5%. С целью концентрирования гомогенной популяции липосом, а также для удаления этанола суспензию полученных липосом центрифугируют при 150 000 *g* в течение 1 ч. Осадок липосом суспендируют в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7,8.

Липосомы, полученные указанными методами, представляют собой бислойные, униламеллярные, сферической формы везикулы диаметром 25—30 нм. Препараты липосом хранят в атмосфере азота или аргона при —20 °С в течение 1 мес. Перед использованием препарата определяют, возможно ли в нем перекисное окисление фосфолипида. С этой целью на спектрофотометре оценивают индекс окисленности, т. е. отношение поглощения суспензии липосом (2 мкмоль лецитина в 3 мл смеси этанол—эфир в соотношении 3:1) при 233 и 215 нм. Поглощение препарата липосом при 233 нм свидетельствует о присутствии в суспензии продуктов перекисного окисления лецитина. В работе ис-

пользуют препараты липосом, индекс окисленности которых не превышает 0,4.

Адсорбция гексокиназы на фосфолипидных мембранах (липосомах). Адсорбцию (иммобилизацию) гексокиназы на липосомах проводят суспендированием препарата липосом (3 мг лецитина) в 1 мл раствора фермента, содержащего различные количества единиц используемого фермента, а также 15 мМ $MgCl_2$ или 5 мМ глюкозу в качестве адсорбирующих реагентов. Контрольная проба адсорбирующих реагентов не содержит. После 30-минутной инкубации при 0°С мембраны, содержащие адсорбированную гексокиназу, отделяют центрифугированием при 100 000 g в течение 1 ч и суспендируют в среде инкубации. Препарат иммобилизованной гексокиназы используют для изучения свойств в день получения.

Степень адсорбции гексокиназы определяют, сравнивая активность фермента в среде инкубации до и после контакта с мембранами:

$$\text{степень адсорбции} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \cdot 100\%,$$

где A_1 — исходная активность гексокиназы до иммобилизации, A_2 — остаточная активность гексокиназы в супернатанте после отделения мембран с иммобилизованным ферментом.

Об активации гексокиназы при адсорбции судят, сравнивая активность фермента, обнаруженного в мембранном препарате, с убылью исходной активности после иммобилизации:

$$\text{степень активации} = \frac{A_3}{A_1 - A_2} \cdot 100\%,$$

где A_3 — активность фермента, связанного с липосомами.

Определение активности гексокиназы. Активность фермента определяют энзиматическим методом по количеству образовавшегося в ходе реакции Г-6-Ф. Метод основан на использовании сопряженной дегидрогеназной реакции согласно схеме (с. 41). За ходом реакции следят на спектрофотометре по увеличению оптической плотности при 340 нм в результате восстановления НАДФ⁺. Показания прибора регистрируют каждые 30 с в течение 3 мин.

Состав реакционной среды объемом 3 мл: 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,8, глюкоза — 3 мМ, АТФ — 8 мМ, $MgCl_2$ — 12 мМ, НАДФ — 0,25 мМ, дегидрогеназа Г-6-Ф — 1 инт. ед. в пробе. Контрольная проба не содержит глюкозу. Реакцию начинают добавлением ферментного препарата.

Расчет активности фермента проводят на основании величин начальной скорости реакции при условии наличия прямой пропорциональной зависимости скорости от количества ферментного препарата в пробе. Скорость гексокиназы выражают в микромолях восстановленного НАДФ⁺ в мин.

Изучение свойств фермента

1. Получают препарат II изозима гексокиназы из растворимой клеточной фракции скелетных мышц крысы. После определения белка микробиуретовым методом оценивают удельную активность фермента, а также степень очистки. При этом учитывают, что на долю II изозима гексокиназы приходится 60% от общего содержания фермента в растворимой клеточной фракции скелетных мышц.

2. Поскольку кроме II изозима гексокиназа скелетных мышц содержит в больших количествах I изозим фермента (до 40%), проводят идентификацию изозимного состава полученного препарата гексокиназы. В качестве критерия при этом используют значение K_m по глюкозе, соответственное равно для I и II изозимов $5 \cdot 10^{-5}$ М и $(1,8-2,4) \times 10^{-4}$ М. С этой целью исследуют зависимость скорости реакции от концентрации глюкозы в диапазоне $3 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ М, используя насыщающую ($8 \cdot 10^{-3}$ М) и полунасыщающую ($7 \cdot 10^{-4}$ М) концентрацию АТФ. В работе используют препараты гексокиназы с высоким содержанием II изозима фермента, для которых характерно значение K_m по глюкозе не ниже $1,8 \cdot 10^{-4}$ М.

3. Изучают влияние 15 мМ $MgCl_2$ и 5 мМ глюкозы на способность гексокиназы связываться с липосомами. С этой целью сопоставляют активность гексокиназы, связанной с липосомами в присутствии и в отсутствие указанных реагентов. Исходная активность фермента в этих экспериментах составляет 0,25 инт. ед. Оценивают степень активации гексокиназы при иммобилизации на мембранах.

4. Проводят сравнительное исследование зависимости скорости реакции от концентрации глюкозы для связанной с липосомами и свободной форм фермента в диапазоне концентраций субстрата $3 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ М. Различными графическими методами оценивают значения K_m по глюкозе. Препарат связанной гексокиназы получают в присутствии в среде для иммобилизации 15 мМ $MgCl_2$ и 5 инт. ед. гексокиназы.

5. Исследуют рН-зависимость активности связанной и свободной форм гексокиназы в диапазоне изменений рН 7,0—8,5. Поскольку прочность связи фермента с мембранами уменьшается при закислении среды, иммобилизацию фермента в данной серии экспериментов проводят при рН 7,0; содержание фермента в пробе составляет 5 инт. ед.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курганов Б. И., Лобода Н. И. Регуляция активности ферментов в адсорбционных ферментных системах//Биоорг. хим. 1977. Т. 3, № 10. С. 1407
2. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы//Под ред. С. Е. Северина, Н. Б. Гусева. М., 1986.
3. Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками М., 1986.
4. Мунтян Е. М., Гончарова Н. Ю. О специфичности взаимодействия изозима II гексокиназы с митохондриальными мембранами//Биохимия. 1986. Т. 51, № 3. С. 404
5. Гончарова Н. Ю., Мунтян Е. М. Взаимодействие изозима II гексокиназы с лецитиновыми липосомами//Биохимия. 1986. Т. 51, № 7. С. 1077.
6. Szoka F., Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)//Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1980. Vol. 9. P. 467.

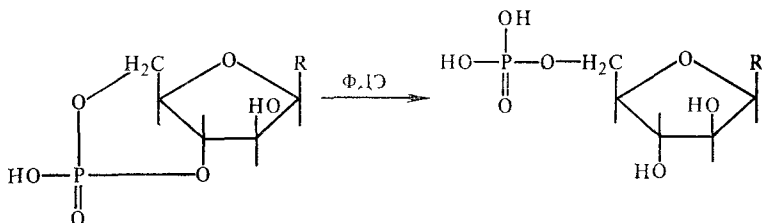
III. РОЛЬ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РЕАЛИЗАЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

1. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ⁵ НУКЛЕОТИДОВ

Уровень цАМФ в клетке определяет многие процессы ее метаболизма. Синтез цАМФ катализирует аденилатциклаза — сложный мем-

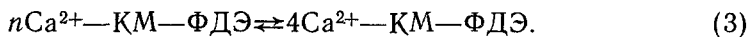
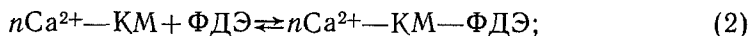
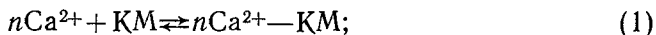
⁵ Работа предложена Бобрускиным И. Д.

бранный комплекс, активируемый со стороны наружной поверхности мембраны гормоном. Распад цАМФ в клетке контролирует фосфодиэстераза циклических нуклеотидов (КФ 3.1.4.1). Фермент обладает многообразием форм и широкой видовой и тканевой специфичностью. Существуют фосфодиэстеразы, избирательные к определенному циклонуклеотиду, растворимые и входящие в состав внутренней поверхности мембраны, активируемые различными по химической структуре природными соединениями. В мозге млекопитающих преобладает Ca^{2+} —КМ-зависимая фосфодиэстераза (ФДЭ), гидролизующая оба пуриновых циклонуклеотида, но с различной константой сродства к субстрату по следующей схеме (R — пуриновое основание):



Высокая скорость реакции гидролиза циклических нуклеотидов возможна только в присутствии миллимолярных концентраций Mg^{2+} . Вытеснение ионов Mg^{2+} другими двухвалентными ионами, в том числе Ca^{2+} , снижает скорость ферментативной реакции. Длительное время фермент считали гомодимером с м. м. = 120 000—130 000 Да, по данным гель-фильтрации. Последними исследованиями показана возможность существования молекулы фосфодиэстеразы в виде двух неидентичных субъединиц с небольшой разницей м. м.: 3000—4000 Да.

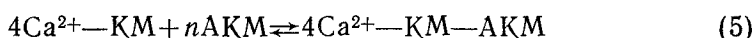
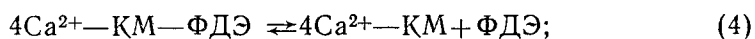
Фосфодиэстераза характеризуется наличием аллостерического центра, взаимодействующего с молекулой кальмодулина (КМ) в присутствии Ca^{2+} . Кальмодулин принято считать универсальным белковым модулятором. Число известных ферментов, подверженных его активирующему действию, довольно велико и продолжает расти. Показано, что кальмодулин, связывая Ca^{2+} , претерпевает конформационные изменения, приобретая основное свойство — активировать фермент — мишень. Интегральная концентрация кальмодулина в клетке достаточно велика (1—10 мкМ), поэтому его модулирующие свойства определены внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} . Взаимодействие Ca^{2+} , кальмодулина и фосфодиэстеразы в первом приближении описывается следующей упрощенной схемой:



Активированной формой фермента принято считать комплекс $4\text{Ca}^{2+} - \text{КМ} - \text{ФДЭ}$. Однако комплекс $n\text{Ca}^{2+} - \text{КМ} - \text{ФДЭ}$ с более низким содержанием Ca^{2+} ($n=1-3$) может тем не менее взаимодействовать с ферментом без его активации (2). Напротив, процесс диссоциации комплекса $n\text{Ca}^{2+} - \text{КМ} - \text{ФДЭ}$ в рамках уравнения (2) медленный, а при высокой концентрации ($\text{КМ} \geq 10$ мкМ) практически отсутствует даже при удалении Ca^{2+} .

В отсутствие кальмодулина эффективная константа сродства фосфодиэстеразы к цАМФ ≥ 200 мкМ, к цГМФ ≥ 10 мкМ.

Активация фосфодиэстеразы при действии комплекса Ca^{2+} —КМ сопровождается увеличением величины V_{max} от 3 до 50 раз и уменьшением эффективной константы сродства фермента к субстрату не более чем в 5 раз в зависимости от способа очистки и времени хранения фермента. Индуцированную комплексом активность фосфодиэстеразы ингибирует большое число различных по своей химической структуре соединений, известных под общим названием «антагонисты кальмодулина» (АКМ). К ним, в частности, относятся лекарственные препараты, широко применяемые в медицине при лечении шизофрении, бронхиальной астмы, злокачественных опухолей и других заболеваний. Взаимодействие антагонистов кальмодулина возможно не только с кальмодулином, но и с фосфодиэстеразой, однако последний эффект обычно не учитывают, так как он появляется при значительно более высоких концентрациях антагонистов, чем первый. Действие этих веществ можно представить следующей упрощенной схемой:



Комплекс $4\text{Ca}^{2+}\text{—КМ—АКМ}$ утрачивает свойство своего предшественника $4\text{Ca}^{2+}\text{—КМ}$ и не активирует фосфодиэстеразу. Для значительной части антагонистов кальмодулина ингибирование сопровождается эффектом положительной кооперативности, что подтверждает гипотезу многоцентрового связывания этих соединений с комплексом $\text{Ca}^{2+}\text{—КМ}$ в процессе ингибирования индуцированной активности фермента.

Цель работы — изучение регуляции фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из мозга крупного рогатого скота при действии кальмодулина.

Очистка фосфодиэстеразы из мозга крупного рогатого скота

Реактивы:

1. Буфер А — 50 мМ трис-НСl (рН 7,0), 0,1 мМ азид натрия, 1,0 мМ меркаптоэтанол (меркаптоэтанол всегда в буфер добавляется непосредственно перед его использованием).
2. Буфер Б — 25 мМ трис-НСl (рН 7,0), 0,1 мМ азид натрия, 1,0 мМ меркаптоэтанол.
3. Буфер В — 25 мМ трис-НСl (рН 7,0), 0,1 мМ азид натрия, 1,0 мМ меркаптоэтанол, 0,2 мМ ЭГТА.
4. NaCl.
5. CaCl_2 — 1 М раствор.
6. HCl — концентрированная.
7. Смолы: 1) ДЭАЭ-ТСК или ДЭАЭ-52; 2) фенил-сефароза 4В.

Гомогенизация и центрифугирование. 100 г мозговой ткани, хранящейся при температуре — 70 °С, измельчают, не дожидаясь нагревания, и гомогенизируют в 250 мл охлажденного буфера А (гомогенизатор типа «Политрон», время гомогенизации — 3—5 мин). Гомогенат центрифугируют в течение 1 ч при 22 000 g («Beckman» J—21, ротор C—14, $t=2^\circ\text{C}$).

Хроматография на ДЭАЭ-ТСК. После центрифугирования супернатант наносят на колонку с анионообменной смолой ДЭАЭ-ТСК (объем колонки ~ 50 мл), предварительно уравновешенную буфером Б. Пос-

ле нанесения супернатанта смолу промывают пятикратным объемом (250 мл) буфера А, содержащего 50 мМ NaCl. Элюцию фосфодиэстеразы осуществляют тем же буфером, содержащим NaCl в конечной концентрации 0,15 М. При этом первые 50 мл (объем колонки) элюата отбрасываются. Конечный объем собранного элюата ~160 мл. Все операции на колонке с ДЭАЭ-ТСК проводят со скоростью 5 мл/мин.

Хроматография на фенил-сефарозе. Разбавленный в два раза буфером Б элюат с ДЭАЭ-ТСК после добавления в него CaCl_2 до конечной концентрации 1 мМ наносят на колонку с фенил-сефарозой, предварительно уравновешенную буфером Б, содержащим 1 мМ CaCl_2 . Объем колонки 20 мл. Смолу промывают буферным раствором Б, содержащим 0,1 М NaCl и 1 мМ CaCl_2 до исчезновения показаний оптической плотности при длине волны 280 нм (на увикорде) в диапазоне 0,05 опт. ед. Скорость промывки — 1 мл/мин. Элюцию фосфодиэстеразы с фенил-сефарозы проводят буфером В. Скорость элюции — 1 мл/мин. Элюцию белка контролируют по изменению оптической плотности при длине волны 280 нм. Элюат собирают до исчезновения оптической плотности. В отсутствие увикорда контроль выше перечисленных операций можно осуществить по объему буфера. При промывке объем буфера близок к пяти, а при элюции — к трем объемам колонки. Фракционирование элюата необходимо начать, пропустив объем элюирующего буфера, равный объему колонки.

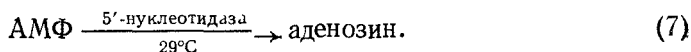
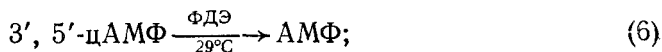
Повторная хроматография на ДЭАЭ-ТСК. Элюат с фенил-сефарозы наносят на колонку ДЭАЭ-ТСК объемом 20 мл, предварительно уравновешенную буфером В, и промывают 60 мл этого буфера. Элюцию фермента осуществляют линейным градиентом NaCl (0—0,3 М) в буфере В. Объем буфера в камерах градиентатора — 2×100 мл. Скорость элюции — 2 мл/мин. Фракционирование необходимо проводить в пробирки по 4 мл.

Определение активности фосфодиэстеразы

Реактивы:

1. цАМФ (концентрацию выбирают, исходя из цели эксперимента).
2. Трис-HCl — 50 мМ (pH 7,0).
3. Ацетат магния — 1 М раствор.
4. Змеиный яд — 2 мг/мл.
5. ЭГТА — $2 \cdot 10^{-2}$ М, pH 7,0.
6. Кальмодулин — 10^{-4} М раствор.
7. CaCl_2 — 10^{-2} М раствор.
8. 50%-ный этанол.
9. Рабочая смесь:
 - а) трис-HCl — 50 мМ, pH 7,0;
 - б) ацетат магния — 10 мМ раствор;
 - в) цАМФ раствор;
 - г) (^3H) -цАМФ — 0,3—0,4 мкКи, раствор.

Активность фосфодиэстеразы определяют по двустадийной методике Томпсона с применением меченного по тритию цАМФ, в основе которой лежит двухступенчатая реакция:



Первая стадия. На первой стадии реакции фосфодиэстераза гидролизует 3',5'-цАМФ до АМФ (6). Реакцию проводят в инкубационной среде, состоящей из 50 мМ трис-НСl (рН 7,0), 10 мМ ацетата магния, цАМФ как субстрата реакции (концентрацию цАМФ выбирают в зависимости от целей эксперимента) и 0,3—0,4 мкКи (³H)-цАМФ для определения скорости реакции по изменению концентрации радиоактивного изотопа в пробе. Дополнительно в соответствии с поставленной задачей инкубационная среда может содержать ЭГТА для определения активности фосфодиэстеразы; свободной от кальмодулина или Са²⁺ и кальмодулина для активации фермента, различные комбинации концентрации Са²⁺, кальмодулина и его антагонистов для определения действия последних на комплексе Са²⁺—КМ—ФДЭ.

Для удобства проведения эксперимента инкубационную среду разделяют на два равных объема по 100 мкл каждый. Первый объем состоит из смеси буфера, различных добавок и фермента. Второй — так называемая «рабочая смесь», состав которой приведен в списке реактивов. Обычно реакцию начинают добавлением раствора 2 в раствор 1. Все компоненты инкубационной среды берут с учетом последующего разбавления, возникающего при смешивании. Реакцию проводят в термостате при 29 °С. Время реакции определяют по величине процента гидролиза цАМФ в конкретной серии экспериментов. Для достоверности экспериментальных данных необходимо удерживать минимальный гидролиз цАМФ в области 10% и максимальный — в области 70% (расчет процента гидролиза цАМФ в пробе на с. 382). Остаткам оставляют реакцию, катализируемую фосфодиэстеразой, кипячением инкубационной смеси в течение 1,5 мин

При работе с антагонистами кальмодулина важна последовательность добавления компонентов первого раствора: 1) буфер, 2) кальмодулин, 3) антагонист, 4) фермент. После тщательного перемешивания раствор преинкубируют 10 мин, затем добавляют второй раствор, начиная тем самым реакцию (7). Во всех экспериментах объем первого раствора доводят буфером до 100 мкл.

Вторая стадия. После охлаждения до 25—30 °С в инкубационную среду добавляют 0,2 мг/мл змеиного яда, тщательно перемешивают и помещают в термостат при 29 °С на 10 мин. 5'-нуклеотидаза, содержащаяся в яде змей, катализирует реакцию, определенную уравнением (7). За указанное время гидролиз АМФ до аденозина проходит практически полностью.

Для отделения негидролизованного субстрата цАМФ от гидролизованного в инкубационную смесь добавляют 1 мл тщательно перемешанной водной суспензии Дауэкса 1×2 в объемном соотношении 1:1. После встряхивания пробирки пробу центрифугируют и супернатант в объеме 300 мкл помещают во флакон. После добавления диоксана-вого сцинтиллятора измерение радиоактивности проводят на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Схема расчета активности фосфодиэстеразы

Для определения активности фермента с помощью радиоактивной метки первоначально находили параметры рабочей среды: фон (радиоактивность в отсутствие фермента) и полный гидролиз (радиоактивность при высоких концентрациях фермента и избыточном времени реакции, позволяющем провести гидролиз цАМФ практически полностью).

Удельную активность фермента рассчитывали, используя следующие формулы:

$$1) \text{срт} - \Phi = \Delta,$$

где *срт* — величина радиоактивности, соответствующая текущему измерению; Φ — величина остаточной радиоактивности пробы в отсутствие фермента;

$$2) \text{ПГ} - \Phi = \text{ПГ}',$$

где *ПГ* — величина счета, соответствующая полному прохождению реакции гидролиза цАМФ в пробе.

Принимая величину *ПГ'* за 100% гидролиза цАМФ, находят количество гидролизованного в ходе ферментативной реакции субстрата:

$$Y = \frac{\Delta \cdot C, \text{ мкмоль}}{\text{ПГ}'},$$

где *C* — начальная концентрация цАМФ в инкубационной среде, *Y* — концентрация гидролизованного в ходе реакции субстрата.

Тогда

$$\text{удельная активность фермента} = \frac{Y, \text{ мкмоль}}{t, \text{ мин} \cdot B, \text{ мг}},$$

где *Y* — количество гидролизованного субстрата, *t* — время реакции гидролиза, *B* — количество белка в пробе.

Для оценки активности фермента удобно пользоваться относительной единицей активности фермента (О.Е.А.):

$$\text{О. Е. А.} = \frac{Y, \text{ мкмоль}}{t, \text{ мин} \cdot B, \text{ мкл}},$$

где *B* — объем препарата фермента в пробе.

1. Измеряют активность фосфодиэстеразы в присутствии Ca^{2+} и кальмодулина на профиле элюции фермента при повторной хроматографии на ДЭАЭ-ТСК. Фракцию с максимальной активностью отбирают для дальнейшего использования в экспериментах. Хранят при температуре $+4^\circ\text{C}$.

2. Исследуют зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации цАМФ.

Диапазон концентраций цАМФ:

а) $5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ М (в присутствии 1 мкМ КМ);

б) $5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-4} М (в присутствии 20 мкМ ЭГТА).

На основании данных экспериментов определяют изменения в эффективных величинах максимальной скорости гидролиза и константы сродства фермента к субстрату при активации фосфодиэстеразы комплексом КМ— Ca^{2+} .

3. Исследуют влияние трифторпиразина и его синтетического аналога W—7 на активность фосфодиэстеразы. В присутствии 50 и 100 нМ кальмодулина определяют зависимость скорости ферментативной реакции от антагонистов кальмодулина в диапазоне концентраций 10^{-6} — 10^{-4} М. Проводят оценку механизма действия антагонистов кальмодулина на фосфодиэстеразу

ЛИТЕРАТУРА

1. Klee C. B., Vanaman T. C. Calmodulin. Advances in protein Chemistry. 1982. Vol. 35. P. 254, 268, 281.

2. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С. Аллостерическая регуляция активности Ca^{2+} -калмодулинзависимой фосфодиэстеразы из мозга крупного рогатого скота/Биохимия. 1987. Т. 52, № 8. С. 1344.

2. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) представляет собой тетрамер, состоящий из химически идентичных субъединиц, каждая из которых формирует один активный центр. Тетрамерная молекула фермента построена по типу димера димеров, т. е. в определенных условиях молекула фермента диссоциирует на два равноценных димера. Это обусловлено тем, что прочность контактов между субъединицами по одной из трех осей симметрии существенно ниже, чем по двум другим, и диссоциация происходит в первую очередь в результате нарушения взаимодействия субъединиц именно по этой оси. При инкубации фермента в растворе в присутствии моновалентных анионов и адениловых нуклеотидов при низкой температуре тетрамерная молекула ГАФД диссоциирует на димеры, которые в растворе достаточно быстро теряют активность. Дальнейшей диссоциации димеров на мономеры в этих условиях не происходит. Своевременное удаление факторов диссоциации ведет к восстановлению тетрамерной структуры ГАФД и ее активности.

Используя фермент, иммобилизованный на нерастворимом носителе, можно создать условия, при которых часть образовавшихся димеров будет находиться в растворе и таким образом может быть удалена из системы, в то время как остальные димеры останутся связанными с носителем. Если в образовании ковалентной связи с носителем участвует одна субъединица молекулы фермента, можно получить гомогенную фракцию иммобилизованных димеров. Реассоциация димеров, связанных с носителем, не происходит из-за ограничения в подвижности матрицы.

Полученные иммобилизованные димеры ГАФД могут быть использованы для определения активности фермента и его устойчивости к ряду неблагоприятных факторов, например к действию мочевины. Таким образом, возникает возможность решить вопрос о необходимости тетрамерной структуры для проявления ферментом каталитической активности, а также сделать определенные заключения о роли иммобилизации как фактора, стабилизирующего фермент.

При образовании ковалентной связи между носителем и двумя субъединицами ГАФД в силу вероятностных факторов образуется набор различных форм иммобилизованного фермента. На рис. 47 пунктиром указана ось, по которой происходит диссоциация тетрамера, один

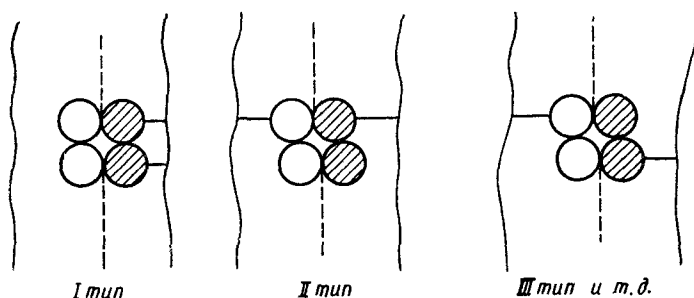


Рис 47. Иммобилизация ГАФД за две субъединицы. Различные варианты. Пунктиром указана ось, по которой происходит диссоциация молекулы на димеры

из функциональных димеров заштрихован, образование связи с носителем равновероятно для всех субъединиц.

В подобной системе существуют два разных типа иммобилизованных тетрамеров: в первом из них связь с носителем образуют субъединицы одного димера, во втором — по одной субъединице из разных димеров. В диссоциирующих условиях тетрамер I типа переходит в два димера: иммобилизованный и растворимый (который в дальнейшем удаляется при промывании), тетрамер II типа остается неизменным. Таким образом, при иммобилизации ГАФД через две субъединицы возможно получить систему, содержащую одновременно димеры и тетрамеры. Корреляция удельной активности фермента с рассчитанным количеством образовавшихся димеров и сохранившихся тетрамеров позволяет судить об активности димерной формы.

Целью работы является сравнение кинетических характеристик ГАФД, растворимой и связанной с нерастворимым носителем, а также получение иммобилизованного димера фермента и изучение его свойств. Методической основой работы является иммобилизация ГАФД на активированной бромцианом агарозе.

Реактивы:

1. BrCN — активированная агароза (производство «Олайне», СССР).
2. Na-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, pH 8,3.
3. Na-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, pH 8,3 и 7,2, содержащий 5 мМ ЭДТА.
4. Глицин — 35 мМ раствор.
5. Нингидрин — 0,2%-ный раствор в ацетоне.
6. Уксусная кислота.
7. Фосфорная кислота — 85%-ный раствор.
8. Этиловый спирт — 96%-ный раствор.
9. Кумасси G-250.
10. Мочевина — 8 М раствор.
11. Реактив Несслера.
12. Глициновый буфер — 0,1 М раствор, pH 8,9.
13. ЭДТА — 0,1 М раствор.
14. Арсенат натрия — 0,1 М раствор.
15. НАД — 60 мМ раствор.
16. Фосфоглицериновый альдегид — 45 мМ раствор.
17. Сефадекс G-50 (колонка 2×10 см).
18. NaCl — 0,15 М раствор, содержащий 5 мМ ЭДТА, pH 7,5.
19. АТФ — 0,1 М раствор, приготовленный на 0,15 М NaCl и 5 мМ ЭДТА, pH 7,5.

Иммобилизация ГАФД. В качестве матрицы, на которой иммобилизуют фермент, в работе используют активированную бромцианом агарозу, имеющую 12—14 активированных групп/мл. Для получения препаратов ГАФД, иммобилизованных через одну или две субъединицы, данная степень активации носителя должна быть понижена. Соответствующая обработка агарозы описана на с. 387.

После подготовки носителя к работе суспензию агарозы уравнивают 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 8,3 (этот буфер может быть сразу использован в процессе обработки агарозы глицином). К уплотненному гелю агарозы (сформировавшемуся после оседания носителя), количество которого эквивалентно 1 г сухого веса агарозы, добавля-

ют 3 мл раствора ГАФД в концентрации 3 мг/мл, предварительно обес-соленного в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,3, содержащем 5 мМ ЭДТА. Для обессоливания используют колонку с сефадексом G-50. Инкубацию ведут 10 мин при комнатной температуре и постоянном осторожном перемешивании. Реакцию останавливают добавлением глицина до конечной концентрации 70 мМ и спустя 1 ч, в течение которого проба перемешивается, агарозу отмывают от адсорбированного белка и глицина. Их отсутствие в элюате определяют соответственно по исчезновению поглощения при 280 нм и с помощью нингидрина (с. 131). Определение концентрации иммобилизованного белка и числа субъединиц, вступивших в реакцию, проводят описанными выше методами (с. 386). Для растворимой ГАФД из мышц кролика используют значения $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ при 280 нм = 12,7. Все эксперименты проводят в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,3.

Методика позволяет получать препараты фермента, иммобилизованные не более чем за две субъединицы. Следует отметить, что при иммобилизации более чем за одну субъединицу в препаратах присутствуют также формы, иммобилизованные за 3 и 4 субъединицы, в количествах, определяющихся вероятностными факторами.

Определение активности иммобилизованной ГАФД. Активность фермента определяется спектрофотометрически по увеличению оптической плотности при 340 нм в результате образования НАДН в ходе реакции. Измерения ведут при комнатной температуре в глициновом буфере 0,1 М, pH 8,9. Реакционная среда содержит 5 мМ ЭДТА, 5 мМ арсенат Na, 3 мМ НАД, 1,5 мМ фосfogлицериновый альдегид и 0,1—0,2 мл суспензии иммобилизованного фермента. Реакцию начинают добавлением субстрата. Проводят сравнение удельной активности, значений K_m и V_{max} для иммобилизованных форм фермента и растворимого фермента.

Получение иммобилизованных димеров ГАФД и их реассоциация с растворимыми димерами. Диссоциацию тетрамеров фермента на димеры проводят при одновременном воздействии низкой температуры, моновалентных анионов и АТФ. Для этого суспензию агарозы с иммобилизованным ферментом вначале промывают раствором 0,15 М NaCl с 5 мМ ЭДТА (pH 7,5), а затем добавляют к ней равный объем 0,1 М раствора АТФ в 0,15 М NaCl с 5 мМ ЭДТА при том же pH и помещают на лед. За ходом диссоциации следят по падению активности фермента, так как переходящий в раствор димер в этих условиях быстро инактивируется. В то же время димер, связанный с носителем, остается активным, что обусловлено стабилизирующим действием матрицы. В пробы для определения активности ГАФД (отбирают каждые 15 мин) вносят суспензию носителя с белком без отмывания АТФ, так как присутствие последнего в используемых концентрациях мало влияет на активность фермента.

Достигнув двукратного снижения активности, АТФ отмывают вначале 0,15 М NaCl с 5 мМ ЭДТА (pH 7,5), а затем 0,1 М Na-фосфатным буфером (pH 8,3), содержащим 5 мМ ЭДТА. В полученном препарате определяют концентрацию белка и рассчитывают удельную активность, сравнивая ее с удельной активностью препарата до проведения диссоциации. При иммобилизации ГАФД за одну субъединицу препарат содержит гомогенные димеры, при иммобилизации за две — смесь димеров и тетрамеров.

Реассоциация иммобилизованных димеров с растворимыми проводится следующим образом. К иммобилизованным димерам добавляют 1—2 объема раствора фермента в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,2), содержащем 5 мМ ЭДТА так, чтобы конечная концентрация фермента

в суспензии была равна 0,2—0,3 мг/мл. Инкубацию проводят в течение ночи при 4 °С, а затем отмывают суспензию указанным буфером. Измеряют активность и содержание белка в препарате и убеждаются в восстановлении тетрамерной структуры фермента и общей активности препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ashmarina L. I., Muronetz V. I., Nagradova N. K. A monomer of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is catalytically active //Biochem. Intern. 1980. Vol. 1, N 1. P. 47.
2. Ashmarina L. I., Muronetz V. I., Nagradova N. K. Immobilized D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can exist as a trimer//FEBS Lett. 1981. Vol. 128, N 1. P. 22.
3. Можаяев В. В. Иммобилизация ферментов как новый подход к решению фундаментальных проблем энзимологии//Усп. биол. хим. 1983. Т. 24. С. 99.
4. Муронец В. И., Наградова Н. К. Имобилизованные олигомерные ферменты. М., 1984.
5. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М., 1986. С. 22.

3. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Изохим М₄ лактатдегидрогеназы (ЛДГ), который используется в работе, состоит из четырех химически идентичных субъединиц, каждая из которых формирует один активный центр. Получение и изучение димеров и мономеров ЛДГ в растворе представляет собой весьма сложную задачу.

Имобилизация ЛДГ на активированной бромцианом агарозе позволяет достаточно легко получать различные формы ЛДГ, в частности мономер. В зависимости от условий эксперимента и степени активации носителя в образовании ковалентных связей между белком и агарозой может участвовать различное число субъединиц фермента. Необходимым условием получения мономерной формы является наличие препарата ЛДГ, иммобилизованного через одну субъединицу.

Определение количества субъединиц, вступивших в реакцию, проводится путем сравнения концентрации иммобилизованного белка до и после обработки 8 М мочевиной. Снижение концентрации белка в суспензии агарозы после инкубации в мочеvine в 4 раза позволяет использовать препарат ЛДГ для получения мономера. Обработка иммобилизованного белка 1,5 М мочевиной приводит к разрушению нековалентных взаимодействий между субъединицами ЛДГ, но не влияет на ковалентную связь субъединицы с матрицей (агарозой). Удаление мочевины из системы при промывании буфером ведет одновременно и к удалению диссоциировавших субъединиц. Оставшийся связанным белок является мономером ЛДГ, который используется для дальнейших исследований.

Целью работы является получение активного мономера лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из мышц свиньи⁶, сравнение каталитических характеристик растворимого фермента и различных форм иммобилизованного белка (тетрамера и мономера), а также изучение стабильности иммобилизованного и растворимого ферментов.

⁶ Аналогичным образом может быть проведена иммобилизация и получение мономера лактатдегидрогеназы из мышц кролика.

Реактивы:

1. ВгСN-активированная агороза (производство «Олайне», СССР).
2. Na-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,4.
3. Na-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,0 и 7,4, содержащий 5 мМ ЭДТА.
4. Глицин — 35 мМ раствор.
5. Нингидрин — 0,2%-ный раствор в ацетоне.
6. Уксусная кислота.
7. Фосфорная кислота — 85%-ный раствор.
8. Этиловый спирт — 96%-ный раствор.
9. Кумасси G-250.
10. Мочевина — 8 М раствор.
11. Реактив Несслера.
12. НАДН — 60 мМ раствор.
13. Пируват натрия — 60 мМ раствор.
14. Сефадекс G-50 (колонка 2×10 см).

Подготовка носителя к работе. В качестве матрицы, на которой иммобилизуют фермент, в работе используют активированную бромцианом агорозу, имеющую 12—14 активированных групп/мл. При использовании препарата-носителя с данной степенью активации получают препарат ЛДГ, иммобилизованный по четырем субъединицам. Для иммобилизации через одну субъединицу исходный препарат агарозы подвергают следующей обработке, ведущей к снижению степени ее активации.

Агарозу помещают на стеклянный фильтр и промывают вначале дистиллированной водой, а затем 0,1 М Na-фосфатным буфером, рН 7,4. Затем к 1 г агарозы (в расчете на сухой вес) добавляют 3 мл указанного буфера, содержащего глицин в концентрации 35 мМ. После 10 мин инкубации при комнатной температуре и постоянном осторожном перемешивании агарозу промывают буфером до полного исчезновения глицина в элюате. Отсутствие глицина контролируют следующим образом: к 1 мл элюата добавляют уксусную кислоту до рН 4,5, а затем 0,2 мл 0,2%-ного раствора нингидрина. Сразу после этого ставят на 5 мин в кипящую баню. При наличии в пробе глицина раствор приобретает фиолетовую окраску.

Иммобилизация ЛДГ. К уплотненному гелю агарозы, сформировавшемуся при оседании агарозы в буфере, в количестве, эквивалентном 3 г сухого веса носителя, добавляют 3 мл раствора ЛДГ в концентрации 1 мг/мл. ЛДГ предварительно обессоливают на колонке с сефадексом G-50, уравновешенной 0,1 М Na-фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 5 мМ ЭДТА. Инкубацию проводят в течение 10 мин при комнатной температуре и постоянном осторожном перемешивании. Реакцию останавливают добавлением глицина до конечной концентрации 70 мМ и спустя 2 ч, в течение которых суспензия находится при комнатной температуре и постоянном помешивании, агарозу отмывают буфером от глицина и адсорбированного белка, контролируя их отсутствие по реакции с нингидрином (белок можно контролировать по поглощению раствора при 280 нм). Полученный препарат хранят в холодильнике.

Определение концентрации иммобилизованной ЛДГ. Концентрацию иммобилизованной ЛДГ определяют по модифицированному методу Бредфорд (с. 85). Приготовленный раствор Кумасси G-250 хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Через 2—

3 нед следует проверить качество реактива. При построении калибровочной кривой используют полностью инактивированную глицином агарозу. Суспензию агарозы удобно вносить после добавления буфера к осевшей агарозе в соотношении 1:1. Все пробы непосредственно перед измерением тщательно перемешивают стеклянной палочкой (в идеальном случае содержимое кюветы перемешивается во время измерения). При работе с ЛДГ из мышц свиньи используют $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ при 280 нм=14,0; для ЛДГ из мышц кролика — $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ при 280 нм=14,5.

Определение числа субъединиц, вступивших в реакцию. Число субъединиц, образовавших ковалентную связь с носителем, определяют измерением концентрации белка в пробах, обработанных 8 М мочевиной, сравнивая ее с исходной концентрацией иммобилизованного фермента.

Вначале суспензии агарозы с иммобилизованным ферментом промывают 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 7,4, затем небольшим объемом 8 М мочевины, после чего добавляют двойной объем раствора мочевины и оставляют на 1 ч при комнатной температуре (или на ночь при 4°C), используя для перемешивания магнитную мешалку. Удаляют раствор мочевины и вновь промывают сначала небольшим объемом 8 М мочевины, а затем указанным выше буфером. Отсутствие мочевины в пробах контролируют с помощью реактива Несслера. Белок в суспензии определяют описанным выше способом. Снижение концентрации белка в суспензии вызвано диссоциацией субъединиц фермента, не образовавших ковалентных связей с группами носителя.

Следует отметить, что при связывании белка с носителем более чем за одну субъединицу в силу вероятностных факторов возникает набор различных форм белка, имеющих разное число «пришитых» субъединиц, и полученный результат является усредненным.

Определение активности иммобилизованной ЛДГ. Активность иммобилизованного фермента определяют так, как описано на с. 299.

Ввиду использования высоких концентраций НАДН, имеющих оптическую плотность выше 1,5 ед. при 340 нм, измерения проводят не в максимуме поглощения НАДН, а при другой длине волны. Для этого обращаются к спектру поглощения НАДН, приведенному в приложении на с. 501. Пользуясь тем, что коэффициент молярной экстинкции НАДН при 340 нм равен $6,22 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$, рассчитывают его значение при других длинах волн. Для измерения активности ЛДГ выбирают длину волны, при которой поглощение раствора не превышает 0,6.

Получение иммобилизованного мономера ЛДГ. К одному объему геля агарозы, несущей иммобилизованный тетрамер ЛДГ, добавляют два объема 1,5 М мочевины. Инкубацию проводят в течение 3 ч при комнатной температуре и постоянном осторожном перемешивании, после чего агарозу промывают 10 объемами 1,5 М мочевины, а затем 0,1 М Na-фосфатным буфером (pH 7,4) до полного исчезновения белка в пробе (контролируют по поглощению раствора при 280 нм). Отсутствие в пробе мочевины контролируют с помощью реактива Несслера. В полученной суспензии определяют содержание белка, как указано выше. Измеряют удельную активность иммобилизованного мономера, определяют величины удельной активности, K_m и V_{max} для субстратов реакции. Сравнивают полученные величины с соответствующими значениями, полученными для иммобилизованного тетрамера ЛДГ и нативного фермента.

Сравнение устойчивости иммобилизованной и растворимой ЛДГ по отношению к мочедине. Проводят 10-минутную инкубацию раствори-

мой формы ЛДГ, иммобилизованных мономера и тетрамера ЛДГ в присутствии 3 М мочевины, после чего определяют активность ЛДГ. Делают заключение о стабилизирующем влиянии иммобилизации на фермент.

ЛИТЕРАТУРА

1. Можаяев В. В. Иммобилизация ферментов как новый подход к решению фундаментальных проблем энзимологии//Усп. биол. хим. 1983. Т. 24. С. 99.
2. Муронец В. И., Наградова Н. К. Иммобилизованные олигомерные ферменты. М., 1984.
3. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М., 1986. С. 22.
4. Ashmarina L. I., Mironetz V. I., Nagradova N. K. Lactate dehydrogenase can function in a monomeric form; the principles of an active subunit preparation//Biochem. Intern. 1982. Vol. 3, N 4. P. 415.

4. ИММОБИЛИЗАЦИЯ АЛЬДОЛАЗЫ И ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА АЛЬДОЛАЗЫ С ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗОЙ

Среди различных типов белок-белковых взаимодействий можно выделить несколько групп. Во-первых, взаимодействие химически идентичных мономеров, ведущее к образованию олигомерной молекулы фермента. Таким образом построены молекулы альдолазы и ГАФД из мышц кролика и многие другие ферменты. К другому типу взаимодействия относится формирование олигомерной молекулы из различных субъединиц, как это имеет место, например, в случае протеинкиназы из мышц. Третий тип белок-белковых взаимодействий — образование надмолекулярных комплексов, т. е. комплексов между различными белками. В частности, подобные взаимодействия имеют место между некоторыми ферментами гликолиза, между ферментами и структурными белками, между ферментами и мембранами.

Целью данной работы является получение комплекса между альдолазой и ГАФД (оба фермента выделяются из мышц кролика) и изучение некоторых свойств альдолазы в этом комплексе.

Методическую основу работы составляет получение иммобилизованного препарата альдолазы, на котором адсорбируется добавленный извне растворимый белок. После удаления несвязанного белка при промывании увеличение концентрации белка в суспензии иммобилизованной альдолазы, а также появление в ней активности ГАФД позволяют сделать заключение о взаимодействии растворимого белка с иммобилизованным (т. е. об образовании комплекса альдолаза—ГАФД).

Реактивы:

1. BrCN-активированная агароза (производство «Олайне», СССР).
2. Na-фосфатный буфер — 0,1 М раствор, pH 7,4.
3. Na-фосфатный буфер — 0,1 М раствор pH 7,4, содержащий 5 мМ ЭДТА.
4. Триэтаноламиновый буфер — 0,1 М раствор, pH 7,6, содержащий 5 мМ ЭДТА.
5. Трис-HCl буфер — 50 мМ раствор, pH 7,5, содержащий 1 мМ ЭДТА.
6. Дигитреитол — 5 мМ раствор на трис-HCl буфере.
7. Глицин.
8. Нингидрин — 0,2%-ный раствор на ацетоне.
9. Уксусная кислота.

10. Фосфорная кислота — 85%-ный раствор.
11. Этиловый спирт — 96%-ный раствор.
12. Кумасси G-250.
13. Мочевина — 8 М раствор.
14. Реактив Несслера.
15. Сефадекс G-50 (колонка 2×10 см).
16. Фруктозо-1,6-дифосфат — 0,1 М раствор.
17. Арсенат натрия — 0,1 М раствор.
18. НАД — 50 мМ раствор.

Иммобилизация альдолазы на BrCN-активированной агарозе. В качестве носителя используется BrCN-активированная агароза, имеющая 12—14 активированных групп/мл.

Агарозу помещают на стеклянный фильтр и промывают сначала бидистиллированной водой, а затем 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 7,4. К суспензии агарозы, количество которой эквивалентно 1 г сухого веса носителя, добавляют 1 мл раствора альдолазы, содержащего фермент в концентрации 1 мг/мл. Предварительно альдолазу обессоливают на колонке с сефадексом G-50 в указанном буфере, содержащем 5 мМ ЭДТА. Инкубацию проводят 10 мин при комнатной температуре и постоянном осторожном перемешивании на магнитной мешалке. Добавляют глицин до конечной концентрации 70 мМ и инкубируют смесь в течение 2 ч при комнатной температуре и перемешивании. Агарозу промывают указанным буфером с ЭДТА до полного исчезновения в элюате глицина и белка. Отсутствие глицина контролируют по реакции с нингидрином (с. 131). Белок определяют по поглощению при 280 нм. Полученный препарат хранят в холодильнике.

Определение количества иммобилизованной альдолазы и числа субъединиц, вступивших в реакцию, проводят описанными выше методами (с. 386). Для растворимой альдолазы из мышц кролика используют значение $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ при 280 нм, равное 9,1.

Определение активности иммобилизованной альдолазы. Активность иммобилизованной альдолазы определяют спектрофотометрически в присутствии сопрягающего фермента ГАФД по нарастанию оптической плотности при 340 нм в результате восстановления НАД. Измерения проводят в 0,1 М триэтаноламиновом буфере, pH 7,6, содержащем 5 мМ ЭДТА. Объем пробы — 3 мл.

Используют следующие конечные концентрации реактивов: фруктозо-1,6-дифосфат — 2 мМ, арсенат Na — 5 мМ, НАД — 2 мМ; иммобилизованная альдолаза — 100 мкл суспензии (удобно разводить осевшую агарозу буфером в соотношении 1:1 и после этого отбирать иммобилизованную альдолазу в пробу на активность). Количество ГАФД, необходимое для полного сопряжения, подбирают экспериментально, внося в пробу нарастающие объемы растворимого препарата. Если двукратное увеличение количества фермента в пробе не приводит к росту активности альдолазы, в работе используют его предшествующий объем. Оптическую плотность измеряют с интервалом 15 с непосредственно после заполнения кюветы. Определяют величины удельной активности, K_m , V_{max} для иммобилизованного фермента и сравнивают их с соответствующими значениями этих параметров растворимой альдолазы.

Получение комплекса иммобилизованной альдолазы с ГАФД. ГАФД из скелетных мышц кролика предварительно инкубируют 10 мин с 5 мМ дитиотрептолом и обессоливают на колонке с сефадексом G-50 в указанном ниже буфере. К иммобилизованному препарату альдо-

лазы добавляют равный объем раствора ГАФД, имеющий концентрацию фермента 6 мг/мл. Инкубацию проводят в 50 мМ трис-НСl буфере (рН 7,5), содержащем 1 мМ ЭДТА, при постоянном осторожном перемешивании на магнитной мешалке. Время инкубации при комнатной температуре составляет 2 ч, при 4 °С — 12—14 ч. По окончании инкубации суспензию отмывают на стеклянном фильтре тем же буфером до исчезновения белка в элюате. Затем количество белка определяют с кумасси G-250 (с. 85). В качестве контроля проводят аналогичный эксперимент, инкубируя ГАФД с агарозой, полностью дезактивированной 70 мМ глицином. Отсутствие белка в данной пробе указывает на то, что неспецифической адсорбции фермента на носителе не происходит.

Убеждаются в появлении активности ГАФД (способ определения см. на с. 253) в суспензии. Измеряют активность иммобилизованной альдолазы без добавления извне растворимой ГАФД (следует отметить, что ее количество, образовавшее комплекс с иммобилизованной альдолазой, недостаточно для полного сопряжения реакции). Определяют значения удельной активности, K_m и V_{max} для иммобилизованной альдолазы после комплексообразования с ГАФД в условиях полного сопряжения реакции. Рассчитывают стехиометрию образовавшегося комплекса, используя следующие значения молекулярной массы ферментов: альдолаза — 160 000 Да, ГАФД — 140 000 Да. Делают заключение о специфичности комплексообразования между использованными ферментами. Для этого делают попытку получить комплекс между иммобилизованной альдолазой из мышц кролика и лактатдегидрогеназой из мышц свиньи по описанной выше методике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grazi E., Trombetta G. Aldolase-substrate intermediates and their interaction with GPDH in a reconstructed glycolytic system//Eur. J. Biochem. 1980. Vol. 107, N 2. P. 369.
2. Ovadi J., Salerno C., Keleti T. et al. Physico-chemical evidence for the interaction between aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase//Eur. J. Biochem. 1978. Vol. 90, N 3. P. 499.
3. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М., 1986. С. 152, 199, 212.
4. Козлова Н. Я., Мельниченко И. В., Ясников А. А. Изучение некоторых свойств иммобилизованной альдолазы/Укр. биох. журн. 1984. Т. 56, № 2. С. 194.

IV. ПОДХОДЫ К ВЫЯВЛЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ УЧАСТКОВ И ГРУПП МОЛЕКУЛЫ ФЕРМЕНТА

1. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ МИОЗИНА, ОБЛАДАЮЩИХ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Частичную деградацию молекулы фермента под действием различных протеаз широко используют в энзимологии как эффективный методический подход, с помощью которого могут быть решены следующие задачи:

а) выявление фрагмента белковой молекулы, содержащего регуляторный участок или активный центр, а также другие участки связывания лигандов;

б) установление аллостерической регуляции на уровне третичной структуры фермента (десенсибилизация фермента к аллостерическому влиянию в результате протеолиза);

в) выявление структурных доменов в молекуле фермента — участков белка, обладающих устойчивостью к протеолизу в результате повышенной жесткости или компактности упаковки белковой цепи.

Молекула миозина имеет массу 500'000 Да и представляет собой гексамер, в состав которого входят две тяжелые цепи (м. м. ок. 200 000 Да) и четыре легкие полипептидные цепи (м. м. — 15 000—20 000 Да). Молекула миозина сильно вытянута в длину, причем ее длинная, стержневая часть образована двумя тяжелыми полипептидными цепями, которые на этом участке имеют структуру α -спирали и к тому же закручены одна вокруг другой в суперспираль. N-концы тяжелых цепей образуют глобулярные «головки», каждая из которых находится в комплексе с двумя легкими цепями. АТФазная активность миозина сосредоточена в «головках», имеющих каждая по одному активному центру. В результате ограниченного протеолиза можно получить два типа протеолитических фрагментов, обладающих в полной мере АТФазной активностью: так называемый тяжелый меромиозин с м. м. 350 000 Да, лишенный большей части стержня, или «хвоста», миозиновой молекулы, а также препараты «головок». Электрофоретическая картина зависит от вида примененной протеазы, ее концентрации и времени обработки белка. «Головки», или, как их называют, субфрагмент-1, полученный путем химотрипсинового протеолиза, при ДСН-электрофорезе дают полосу 96 000 Да — фрагмент тяжелой цепи, и две полосы легких цепей — примерно 18 000 и 15 000 Да. Две другие легкие цепи отсутствуют вследствие дегградации. Тяжелый меромиозин обычно дает целый набор полос, среди которых присутствуют: 81 000 Да, 74 000, 51 000, 37 000, 25 000, 21 000 и некоторые другие. Большинство этих полос соответствует различным фрагментам тяжелых цепей. Следует обратить внимание на то, что, несмотря на наличие разрывов в полипептидных цепях, активность тяжелого меромиозина как АТФазы в полной мере сохраняется. АТФазную активность определяют так же, как и для миозина (с. 393).

Получение препарата миозина

Методы выделения миозина основаны на различной растворимости миозина и актомиозина в растворах солей различной ионной силы и сводятся к многократному последовательному осаждению и растворению миозина в растворах хлористого калия разной концентрации.

Реактивы⁷:

1. KCl — х. ч. (кристаллический).
2. KCl — 0,5 М раствор.
3. Раствор Бейли, свежеприготовленный: 0,03 М NaHCO₃ на 0,5 М KCl.

Получение экстракта. Мышечную ткань (15—20 г) измельчают на льду ножницами и гомогенизируют 30—40 с 1 объемом раствора Бейли. К гомогенату добавляют еще 2 объема раствора Бейли и смесь оставляют на холоде на 15—20 мин, время от времени осторожно помешивая ее стеклянной палочкой. Гомогенат центрифугируют на центрифуге с охлаждением в течение 15—20 мин при 10 000—12 000 об/мин.

Осаждение актомиозина. Центрифугат фильтруют через двойной слой марли (для удаления жира) и разводят охлажденной бидистиллированной водой так, чтобы конечная концентрация KCl (с учетом объема мышечной массы) была равна 0,25 М (воду добавляют медленно, при непрерывном помешивании). Если актомиозин сразу не выпадает в осадок, раствор следует оставить на холоде на 0,5—2 ч. Об-

⁷ Все растворы должны быть приготовлены на бидистиллированной воде, так как активность миозина резко падает в присутствии солей тяжелых металлов.

разовавшуюся желатинообразную массу энергично встряхивают и центрифугируют 15—20 мин при 12 000 об/мин. Осадок актомиозина отбрасывают.

Осаждение миозина. Полученный центрифугат разводят бидистиллированной водой до конечной концентрации KCl 0,025—0,03 М, оставляют на 1 ч на льду и центрифугируют 20 мин при 2500 об/мин (можно оставить раствор миозина на ночь и перед центрифугированием декантировать жидкость над осадком). Осадок миозина переносят стеклянной палочкой в мерную пробирку и растворяют его добавлением сухого KCl до конечной концентрации 0,5 М.

Переосаждение миозина. Раствор миозина разводят водой до концентрации KCl , равной 0,03—0,04 М, осторожно перемешивают и центрифугируют 20 мин при 2500 об/мин. Осадок миозина вновь растворяют, добавляя сухой KCl . Эту операцию повторяют еще раз.

Раствор миозина хранят либо при 0—4 °С в течение трех—четырех недель, либо (для длительного хранения в течение года) добавляют глицерин до 50% и помещают в морозильную камеру при —10°——15°С.

В растворе миозина проводят определение белка одним из колориметрических методов (с. 81) и определяют активность фермента.

Определение активности полученного препарата миозина

Об активности фермента судят по количеству неорганического фосфата, который образуется при действии миозина на АТФ в присутствии Ca^{2+} .

Реактивы:

1. Трис- HCl буфер — 0,05 М раствор (рН 7,6), приготовленный на 0,1 М KCl ⁸.
2. CaCl_2 — 0,1 М раствор.
3. АТФ — 0,05 М раствор, нейтрализованный до рН 7,0.
4. CCl_3COOH — 5 и 7,5%-ные растворы.
5. Реактивы для определения неорганического фосфора по Фiske — Суббароу (с. 34).

Инкубационную смесь составляют, смешивая компоненты в следующем соотношении: на 1 мл раствора буфера 0,2 мл CaCl_2 , 0,3 мл раствора АТФ, 0,3 мл воды. После смешивания всех компонентов проверяют рН инкубационной смеси и при необходимости вновь доводят рН до 7,5—7,6. Только после этого начинают реакцию, добавляя в пробу 0,2 мл раствора миозина, содержащего 2—3 мг белка. Смесь хорошо перемешивают и инкубируют при 26 °С в течение 3—5 мин. Реакцию останавливают добавлением 1 мл 7,5%-ного раствора CCl_3COOH . Раствор тотчас же фильтруют и в фильтрате определяют неорганический фосфат, образовавшийся в процессе ферментативного расщепления АТФ. Для определения предобразованного фосфата параллельно ставят контрольную пробу, в которую CCl_3COOH приливают к инкубационной смеси перед добавлением миозина.

Для наблюдения за ходом реакции во времени готовят 10 мл инкубационной смеси такого же состава и инкубируют ее при 20 °С. Сра-

⁸ Можно использовать также гистидиновый или имидазольный буфер (0,05 М, рН 7,2).

зу же после добавления раствора миозина и в дальнейшем через каждые 1—2 мин из нее отбирают по 1 мл реакционной смеси, которые приливают к 1 мл охлажденного 5%-ного раствора CCl_3COOH . В фильтратах определяют прирост неорганического фосфата.

Определение неорганического фосфата. К 1 мл фильтра добавляют 1,0 мл воды, 0,4 мл молибденового реактива и 0,1 мл рабочего раствора эйконогена, хорошо перемешивают и оставляют на 10 мин в термостате при 37 °С. Раствор быстро охлаждают и тотчас же колориметрируют на ФЭКе. Одновременно строят калибровочный график по стандартным растворам фосфата, содержащим от 0,2 до 2 мкмоль фосфата в пробе (с. 34). По разности содержания неорганического фосфата в пробах после ферментативного гидролиза и в контрольной пробе рассчитывают количество фосфата, образовавшегося в процессе ферментативного расщепления АТФ. Затем рассчитывают активность миозина — в мкмольях превращенного субстрата за 1 мин на 1 мг белка.

Получение препарата тяжелого меромиозина

Метод получения тяжелого меромиозина (ТММ) основан на частичном протеолитическом расщеплении миозина под действием трипсина. Отделение тяжелого меромиозина от миозина и от фрагмента хвостовой части миозиновой молекулы (легкого меромиозина) основано на его хорошей растворимости при низкой ионной силе, когда легкий меромиозин и миозин выпадают в осадок. Для последующей очистки полученного препарата можно воспользоваться колоночной хроматографией или высаливанием сернокислым аммонием.

Реактивы:

1. Имидазольный буфер — 30—50 мМ раствор, рН 7,6, приготовленный на 0,5 М KCl .
2. Трипсин.
3. Ингибитор трипсина из соевых бобов.
4. Насыщенный раствор сернокислого аммония, перекристаллизованного с ЭДТА (довести рН раствора до нейтрального или слабощелочного значения).
5. BaCl_2 — насыщенный раствор.
6. Трис- HCl буфер — 0,05 М раствор (рН 7,9).
7. KCl — 0,5 М раствор.
8. ЭДТА — 5 мМ раствор.
9. ДЭАЭ-целлюлоза (ДЭАЭ-52, ватман).

Переваривание миозина и получение раствора тяжелого меромиозина. Тяжелый меромиозин получают перевариванием миозина трипсином при комнатной температуре. К раствору миозина добавляют имидазольный буфер, приготовленный на 0,5 М KCl (рН 7,6), до конечной концентрации имидазола 10 мМ и белка 30—40 мг/мл (можно меньше). Раствор трипсина в 0,5 М KCl добавляют к раствору миозина, соблюдая весовое соотношение трипсин — миозин 1:100. Через 30—40 мин протеолиз останавливают добавлением раствора ингибитора трипсина из соевых бобов в двукратном избытке по сравнению с весовым количеством трипсина⁹. Трипсиновый гидролизат диализуют в течение ночи

⁹ Чтобы раствор миозина сильно не разводить, желательно, чтобы объемы растворов трипсина и ингибитора трипсина не превышали 0,1—0,2 объема миозина.

против десятикратного объема бидистиллированной воды. При этом происходит выпадение в осадок непереваренного миозина и легкого меромиозина, которые нерастворимы при низкой ионной силе. Осадок удаляют центрифугированием при 10 000 g на центрифуге с охлаждением в течение 10 мин. Супернатант, содержащий хорошо растворимый в воде ТММ, можно использовать в качестве препарата ТММ для ряда экспериментов с АТФазной активностью, но при необходимости его подвергают последующей очистке.

Очистка препарата тяжелого меромиозина осаждением сернокислым аммонием. Наиболее простым способом очистки служит высаливание фермента сернокислым аммонием. При этом собирают фракцию, выпадающую между 40—60% насыщения. Следует, однако, соблюдать два условия: во-первых, использовать сернокислый аммоний, перекристаллизованный с ЭДТА, так как даже следовые количества ионов магния, прочно связываясь с ТММ, ингибируют активность, и, во-вторых, перед добавлением к раствору фермента раствора насыщенного сернокислого аммония необходимо проконтролировать рН последнего и в случае необходимости довести его до нейтрального или слабощелочного. Выпавший в осадок тяжелый меромиозин отделяют центрифугированием, растворяют в небольшом объеме (3—6 мл) бидистиллята и диализуют при 0—4 °С в течение ночи против 1 л бидистиллированной воды, чтобы освободиться от сернокислого аммония. Внешний раствор несколько раз меняют и проводят контроль на присутствие в нем ионов SO_4^{2-} с помощью насыщенного раствора хлористого бария. В диализном мешочке может вновь выпасть осадок, который следует отцентрифугировать и отбросить. В надосадочной жидкости одним из общепринятых методов определяют содержание белка, которое обычно составляет 1—10 мг/мл.

Очистка препарата тяжелого меромиозина с помощью ионообменной хроматографии. Для очистки фермента можно также воспользоваться методом колоночной хроматографии. Для этого супернатант после осаждения миозина и легкого меромиозина (15—30 мл) наносят на колонку (2×11 см) с ДЭАЭ-целлюлозой (ДЭАЭ-52, ватман), уравновешенную 50 мМ трис-НСl буфером, рН 7,9. После нанесения белка колонку промывают двумя объемами того же буфера. Белок элюируют линейным градиентом KCl от 0 до 0,5 М (2×250 мл).

Тяжелый меромиозин элюируется с колонки одним пиком. Фракции этого пика диализуют в течение 1 ч против раствора с 5 мМ ЭДТА, затем в течение ночи против бидистиллированной воды (2—3 смены). Следует помнить, что все операции по выделению и очистке проводятся на холоде. Раствор фермента в бидистиллированной воде хранят в холодильнике и используют в течение 2—3 нед.

Получение субфрагмента-1 (без ДТНБ-легких цепей) папаиновым перевариванием миозина

Реактивы:

1. $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ — 0,2 М раствор с 2 мМ ЭДТА. рН 7,0.
2. Папаин.
3. Цистеин — 25 мМ раствор, рН 6,5.
4. $\text{CH}_2\text{I}\text{COOH}$ — 10 мМ раствор, рН 7,0
5. Трис-НСl буфер (рН 7,5) — 30 мМ раствор.
6. ДЭАЭ-целлюлоза (ДЭАЭ-52, ватман).
7. Трис-НСl буфер — 30 мМ (рН 7,5), приготовленный на 90 мМ KCl.

8. ЭДТА — 5 мМ раствор.

Подготовка миозина и папаина. Папаиновый субфрагмент-1 миозина получают, используя в качестве протеазы папаин. Перед проведением протеолиза необходима специальная подготовка раствора миозина, которая заключается в диализе его (20 мг/мл в 0,5 М КСl) в течение ночи против 30-кратного объема 0,2 М ацетата аммония (рН 7,0), содержащего 2 мМ ЭДТА. Препарат папаина непосредственно перед использованием необходимо активировать в течение 1 ч путем инкубации при 37 °С в среде, содержащей 2 мг/мл папаина и 25 мМ цистеина, рН 6,5.

Переваривание миозина папином. Переваривание миозина папином проводят в течение 30 мин при комнатной температуре при весовом соотношении папаина к миозину 1:200. Реакцию протеолиза останавливают добавлением отнейтрализованного КОН раствора моноiodоуксусной кислоты (рН 7,0) до конечной концентрации 1 мМ. Папаиновый гидролизат центрифугируют при 105 000 g в течение 90 мин. Супернатант, представляющий собой раствор головок миозина, диализуют в течение ночи против десятикратного объема 30 мМ трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 1 мМ моноiodоуксусной кислоты. Диализат наносят на колонку (2×11 см) с ДЭАЭ-целлюлозой (ДЭАЭ-52, ватман), уравновешенную 30 мМ трис-НСl буфером, рН 7,5. После нанесения белка колонку промывают двумя объемами этого же буфера. Белок элюируют 90 мМ КСl в 30 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5. Фракции белка диализуют в течение 1 ч против 5 мМ ЭДТА, затем в течение ночи против бидистиллированной воды (2—3 смены). Препарат субфрагмента-1 с концентрацией белка 2—3 мг/мл хранят в течение 10—15 дней.

Получение субфрагмента-1 химотрипсиновым перевариванием миозина

Реактивы:

1. КСl — 0,5 М раствор.
2. Na-фосфатный буфер — 20 мМ (рН 7,0), содержащий 0,12 М NaCl и 1 мМ ЭДТА.
3. α -химотрипсин.
4. Раствор фенилметансульфонилхлорида в этиловом спирте — 100 мМ.
5. Трис-НСl буфер — 50 мМ, рН 7,0.
6. ЭДТА — 5 мМ раствор.

Раствор миозина (20 мг/мл) в 0,5 М КСl диализуют в течение ночи против 25-кратного объема 20 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 0,12 М NaCl и 1 мМ ЭДТА. К раствору миозина добавляют водный раствор α -химотрипсина до конечной концентрации 0,05 мг/мл. Через 15 мин реакцию протеолиза останавливают добавлением 100 мМ раствора фенилметансульфонилхлорида в этиловом спирте до конечной концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М для ингибирования реакции протеолиза. От избытка ингибитора освобождаются диализом против 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,0 (2—3 смены). Химотрипсиновый гидролизат центрифугируют при 45 000 g в течение 30 мин для отделения нерастворимых в воде легкого меромиозина и непереваренного миози-

на. Супернатант диализуют в течение 1 ч против 5 мМ ЭДТА, затем в течение ночи против бидистиллированной воды (2—3 смены). Препарат головок (субфрагмента-1) с концентрацией 4—5 мг/мл хранят при 4 °С и используют в течение 10—15 дней. Из 1 г миозина получали 150—200 мг субфрагмента-1.

Электрофоретический анализ препаратов миозина и его протеолитических фрагментов с АТФазной активностью

Электрофорез проводят в пластинах полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза с вертикальным расположением пластин производства объединения «Хийу Калур» (ЭССР). Основные и рабочие растворы готовят по методике Лэммли (с. 121).

Для построения калибровочной кривой при определении молекулярных масс используют белки-стандарты: тропонин С (18 000 Да), тропонин I (24 000 Да), тропонин Т (38 000 Да), яичный альбумин (42 000 Да) и бычий сывороточный альбумин (68 000 Да), а также стандартный набор для определения молекулярной массы белков. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препарат миозина дает расположенную почти у старта интенсивную полосу тяжелых цепей с м. м. ок. 20 000 Да и три слабые, но отчетливые полосы легких цепей с м. м. ок. 20 000 Да для самой «тяжелой» из них и около 16 000 Да — для самой легкой. Подвижность этих полос в описанных выше условиях высока, поэтому при достаточно большой продолжительности электрофореза эти полосы могут обнаружиться почти у фронта красителя (бромфенолового синего).

Препарат субфрагмента-1, полученного методом химотрипсинового протеолиза, при электрофорезе в ДСН дает полосу фрагмента тяжелых цепей с м. м. 96 000 Да и две полосы легких цепей — с м. м. 20 000—21 000 Да и 16 000—17 000 Да. Легкие цепи с м. м. 18 000—19 000 Да полностью деградируют при химотрипсиновом протеолизе. Примерно такая же карта наблюдается и в случае субфрагмента-1, полученного методом папаинового протеолиза, однако подвижность одной из легких цепей может возрасти вследствие ее частичной деградации.

Сложную картину с большим числом полос наблюдают при электрофорезе препарата тяжелого меромиозина в присутствии додецилсульфата натрия. В этом случае представляет интерес сопоставить данные по электрофорезу препарата ТММ (тяжелого меромиозина) в диссоциирующих и в недиссоциирующих условиях. Нативный электрофорез в этом случае проводят в трис-глициновом буфере (рН 8,9) на пластинах с 5%-ным разделяющим гелем и 2,5—3%-ным концентрирующим гелем. В этом случае препарат тяжелого меромиозина дает в основном одну полосу, расположенную недалеко от старта, с м. м. 350 000 Да. Это свидетельствует о том, что, несмотря на наличие многочисленных внутренних разрывов в полипептидных цепях, возникших в результате протеолиза, фрагменты цепей держатся вместе за счет нековалентного взаимодействия. При этом обеспечивается функциональная целостность структуры (сохранение АТФазной активности).

ЛИТЕРАТУРА

1. Поглазов Б. Ф., Левницкий Д. И. Миозин и биологическая подвижность. М., 1982.
2. Методы практической биохимии. М., 1978. С. 65.
3. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., 1981. С. 249.
4. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985. С. 109.

2. РОЛЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП И ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИОЗИНА

Одним из методов выявления функционально значимых групп в ферментах является метод химической модификации. Как правило, эти группы обладают более высокой реактивностью, чем такие же группы, не входящие в активный центр или регуляторный участок. Благодаря этому в какой-то степени преодолеваются ограничения метода, связанные с его недостаточной специфичностью, и применение химической модификации оказывается достаточно эффективным подходом в целом ряде случаев. Для подтверждения специфичности модификации (т. е. для того, чтобы удостовериться, что модификация произошла в активном центре или другом функционально значимом участке) пользуются критерием защиты от модификации или потери активности в присутствии субстрата или иного специфического лиганда.

На примере миозиновой АТФазы рассматривается случай химической модификации с помощью некоторых сульфгидрильных реагентов, доказывающего участие SH-групп в регуляции активности миозина (SH-группы непосредственно в активный центр этого фермента не входят), а также устанавливается важная роль гидрофобных взаимодействий в осуществлении регуляторного влияния на АТФазную активность миозина. Демонстрируется также стабилизирующее действие АТФ на структуру активного центра миозина.

Миозин, будучи АТФазой, относится к числу так называемых энергопреобразующих ферментов, так как при его непосредственном участии осуществляется трансформация энергии химических связей в механическую работу. Для ферментов такого типа характерна тесная связь катализа с конформационными перестройками. За счет этого возможна регуляция активности фермента путем воздействия на группы, не входящие непосредственно в активный центр, а также при воздействии на него веществ, влияющих на конформацию белка. Совершенно очевидно, что субстрат (АТФ) должен в большинстве случаев оказывать защитное действие, стабилизируя структуру в области активного центра.

Известно, что из 30—34 сульфгидрильных групп, обнаруживаемых в молекуле миозина (в расчете на 500 000 Да), для активности существенными оказываются 4 (по 2 на каждый активный центр). Несмотря на то что они не входят непосредственно в активный центр, их блокирование различными SH-реагентами приводит сначала к резкой активации, а затем к полному исчезновению АТФазной активности. Для активации оказывается необходимым наличие органического слабополярного фрагмента у модифицирующего вещества.

Активация миозиновой АТФазы может быть также достигнута путем внесения в среду инкубации неполярных или слабополярных органических растворителей, что свидетельствует о важной роли гидрофобных взаимодействий в осуществлении регуляции активности миозина.

Влияние модификации сульфгидрильных групп под действием ПХМБ на АТФазную активность миозина (или тяжелого меромиозина)

Реактивы:

1. ПХМБ— $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор, pH 7,6—8,0.

2. АТФ: 4 мг/мл АТФ, 0,5 М КСl, $1 \cdot 10^{-4}$ М СаСl₂, 3,5—5 мг/мл трис (рН раствора доводится до 7,6 после смешивания всех компонентов).
3. Трихлоруксусная кислота — 20%-ный раствор.
4. Реактивы для определения неорганического фосфата методом Фиске и Суббароу.
5. КСl — 0,5 М раствор.

Готовят ряд пробирок (12 шт.), в которые разливают по 1,4 мл раствора миозина в 0,5 М КСl, содержащего 0,8—0,9 мг/мл (для удобства сопоставления результатов раствор должен быть таким же, какой использовали для определения содержания сульфгидрильных групп методом спектрофотометрического титрования — см. с. 159).

Затем в каждую пробу с интервалами в 30 с (по секундомеру) добавляют соответственно следующие количества раствора ПХМБ: 0,00 мл; 0,02 мл; 0,04 мл; 0,06 мл; 0,07 мл; 0,075 мл; 0,08 мл; 0,085 мл; 0,090 мл; 0,10 мл, тщательно перемешивая взбалтыванием каждую пробу сразу же после добавления раствора ПХМБ. В две последние пробы ничего не добавляют. Незначительными различиями в объемах проб вследствие добавления различных количеств ПХМБ пренебрегают при последующих расчетах. По истечении 10 мин от начала добавления ПХМБ во все пробы (кроме двух последних) приливают (также с 30-секундными интервалами) по 0,6 мл раствора АТФ. Время инкубации миозина с АТФ должно составлять 20—30 мин. По окончании инкубации во все пробы (включая две последние) добавляют по 0,3 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. В две последние пробы после ее добавления приливают по 0,6 мл раствора АТФ. Эти пробы будут служить контролем на содержание неорганического фосфата в реактивах и на фон за счет расщепления АТФ в кислой среде.

Осадок белка удаляют фильтрованием. На определение неорганического фосфата из каждой пробы после фильтрования берут по 0,8 мл ТХУ-фильтрата, добавляют по 0,1 мл неразведенного раствора эйконогена, 0,3 мл молибденового реактива и по 1,3 мл воды. Через 10—15 мин выдерживания на водяной бане (или в термостате) при 37—40 °С пробы колориметрируют. Учитывая нестабильность стандартной кривой при определении неорганического фосфата методом Фиске—Суббароу, желательно одновременно с опытными пробами ставить 3—5 проб с разными количествами стандартного раствора неорганического фосфата.

Активность миозина в пробах рассчитывают в микромолях неорганического фосфата за 1 мин на 1 мг белка. Проводят сопоставление кривой титрования сульфгидрильных групп миозина ПХМБ и кривой изменения его активности при разной степени модификации. Отмечают полную потерю активности ферментом при 100%-ном блокировании SH-групп, а также 1,5—3-кратную активацию АТФазы при блокировании до 50% SH-групп.

Сопоставление влияния органических (ПХМБ) и неорганических (Ag⁺, Hg²⁺) реагентов на SH-группы при использовании их для модификации миозиновой АТФазы

Реактивы:

1. —5: см. с. 398.
6. HgCl₂ — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор.
7. AgCl₂ — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор.

Постановка эксперимента полностью идентична вышеописанной, при этом сопоставляют действие ПХМБ, ионов серебра ($5 \cdot 10^{-4}$ М р-р AgCl_2) и ионов двухвалентной ртути ($5 \cdot 10^{-4}$ М раствор HgCl_2) на АТФазную активность миозина. Убеждаются в том, что: а) неорганические SH-реагенты не вызывают, в отличие от ПХМБ, активации миозиновой АТФазы (т. е. активация под действием ПХМБ, по-видимому, обусловлена взаимодействием его слабополярной органической части с гидрофобными группами белка); б) для полного блокирования АТФазной активности требуется такое же количество ионов серебра, как и количество ПХМБ, но вдвое меньшее количество двухвалентной ртути, что говорит в пользу попарно сближенного расположения сульфгидрильных групп в молекуле миозина.

Роль гидрофобных взаимодействий в АТФазной активности миозина

Реактивы:

1. Толуол.
2. Октанол.
3. Динитрофенол — 100 мМ раствор¹⁰.
4. Среда инкубации: 0,5 М KCl , 0,02—0,04 мМ трис- HCl , $1-2 \times 10^{-2}$ М CaCl_2 , 5—7 мг/мл АТФ, рН среды инкубации доводится до 7,6 после смешивания всех компонентов.
5. Остальные растворы: см. с. 393.

Для определения АТФазной активности к 1 мл среды инкубации добавляется 0,1 мл раствора миозина в 0,5 М KCl , содержащего около 10 мг белка в 1 мл. По завершении инкубации (обычно 10—15 мин) реакцию останавливают добавлением 1 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты и в ТХУ-фильтрате определяют неорганический фосфат методом Фiske—Суббароу (с. 34).

Желательно ставить по три параллельные пробы для каждого варианта постановки эксперимента, например:

- 1) три пробы, в которых будет определяться содержание неорганического фосфата в реактивах (контроль); здесь в среду инкубации до добавления фермента приливают ТХУ либо вместо раствора фермента добавляют 0,1 мл воды (препарат миозина не содержит неорганического фосфата);
- 2) три пробы, в которых АТФазная активность определяется без каких-либо добавок, т. е. в отсутствие модификаторов;
- 3) три пробы, в каждую из которых добавлено по одной капле толуола, — до добавления раствора фермента (при этом образуется грубодисперсная эмульсия);
- 4) три пробы, в которые до добавления раствора фермента в среду инкубации добавляется по одной капле октанола (здесь также образуется грубодисперсная эмульсия);
- 5) три пробы, в которых среда инкубации содержит 20 мМ динитрофенола (ДНФ).

В результате эксперимента удостоверяются в том, что добавление в среду инкубации толуола, октанола или динитрофенола приводит к

¹⁰ При приготовлении раствора для лучшего растворения динитрофенола необходимо добавить несколько капель 2 н. KOH , а затем рН раствора осторожно довести до значений, близких к нейтральным.

возрастанию АТФазной активности миозина, несмотря на то, что в пробах выпадают хлопья белка, что визуальнo воспринимается как денатурация. Наименьшее активирующее действие проявляется в случае толуола — неполярного соединения. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что гидрофобные взаимодействия в молекуле миозина могут участвовать не только в поддержании определенной пространственной структуры белка, но и в регуляции его активности.

Защитное действие субстрата при воздействии на фермент модифицирующих реагентов

а. Защита миозиновой АТФазы аденозинтрифосфатом от потери активности под действием ДНФ (реактивы — см. с. 393). Описанная в предыдущей задаче активация миозина под действием ДНФ наблюдается только в случае, когда ДНФ присутствует в среде инкубации, т. е. одновременно с АТФ (субстратом).

Растворы и условия постановки эксперимента аналогичны описанным в предыдущей задаче. Ставится четыре варианта проб:

- 1) три пробы для определения неорганического фосфата в среде инкубации (контроль);
- 2) три пробы для определения АТФазной активности в отсутствие ДНФ;
- 3) три пробы для определения АТФазной активности в присутствии ДНФ (ДНФ содержится в среде инкубации);
- 4) три пробы, в которых растворы фермента и ДНФ смешивались до добавления среды инкубации (т. е. время взаимодействия миозина с ДНФ в отсутствие субстрата будет составлять от 30 с до 1—2 мин).

Для удобства эксперимента желательно иметь раствор ДНФ с концентрацией 100 мМ, добавляя его по 0,1 мл или в среду инкубации (вариант 3), или к 0,1 мл раствора миозина (вариант 4). Для выравнивания объемов в первые 6 проб (варианты 1 и 2) следует добавить по 0,1 мл воды. Однако при такой постановке эксперимента, строго говоря, не обеспечиваются одинаковые условия взаимодействия фермента с модификатором в вариантах 3 и 4 из-за их концентраций в момент контакта и на первых этапах взаимодействия. Поэтому следует предусмотреть и такую постановку эксперимента, когда в варианте 4 аликвота фермента (0,1 мл) разводится 0,5 М КСl до 1 мл, затем сюда добавляется 0,1 мл раствора ДНФ и после 0,1 мл среды инкубации, в 10 раз более концентрированной, чем в трех первых вариантах. В результате эксперимента убеждаются в том, что: а) модифицирующий реагент (ДНФ) вызывает инактивацию фермента в отсутствие субстрата и что субстрат защищает фермент от инактивации; б) активирующее действие ДНФ на АТФазную активность миозина проявляется только в присутствии АТФ.

б. Защита миозиновой АТФазы аденозинтрифосфатом от модифицирующего влияния на нее ПХМБ. Реактивы и условия постановки эксперимента аналогичны тем, которые описаны на с. 398.

Сравнивается АТФазная активность миозина в двух рядах проб. В первом ряду порядок смешивания растворов следующий: сначала к раствору миозина добавляется раствор ПХМБ, а после взаимодействия белка с модификатором, продолжающегося в течение 5 мин, добавляется инкубационная среда, содержащая АТФ. Время инкубации — 25—30 мин.

Для второго ряда проб заготавливаются пробирки, в которых к 0,6 мл раствора инкубационной среды добавляются такие же, как и в первом ряду, количества раствора ПХМБ, а затем реакцию начинают, добавляя в каждую пробирку по 1,4 мл раствора миозина. Поскольку время инкубации (до 30 мин) значительно превышает время предварительного взаимодействия миозина с ПХМБ в первом ряду пробирок, то различием во времени контакта белка и модификатора в двух первых сериях проб можно пренебречь. Одновременно следует удостовериться, что при взаимодействии с АТФ АТФазная активность миозина даже в присутствии ПХМБ стабильна и не меняется за все время проведения АТФазной реакции. Для этого в отдельном эксперименте определяют зависимость нарастания неорганического фосфата от времени в присутствии количеств ПХМБ, достаточных для 50—70%-ной модификации белка.

Принцип постановки эксперимента описан в разделе «Получение миозина и определение его АТФазной активности».

ЛИТЕРАТУРА

1. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М., 1977.
2. Поглазов Б. Ф., Левицкий Д. И. Миозин и биологическая подвижность. М., 1982.
3. Гауровиц Ф. Химия и функция белков. М., 1965. С 36.

Настоящий раздел практикума посвящен экспериментальным приемам, использующимся при изучении биоэнергетических механизмов тканей животных. Употребление понятия «биоэнергетика» применительно к данному разделу требует некоторых пояснений. Любую ферментативную реакцию можно характеризовать как с точки зрения химического механизма и скорости ее протекания, так и с позиций энергетики — установление констант равновесия отдельных стадий или суммарного процесса, непосредственно связанных с термодинамическими понятиями и величинами. Тем не менее, говоря о биоэнергетике, обычно подразумевают реакции, приводящие к эндоэргоническому образованию АТФ из АДФ и неорганического фосфата. К таким реакциям относятся дыхательное фосфорилирование, фотофосфорилирование и реакции субстратного фосфорилирования АДФ, связанные с гликолизом и протеканием цикла трикарбоновых кислот. В силу традиции исследования в области биоэнергетики на кафедре биохимии МГУ ограничены тканями животного происхождения. С количественной же точки зрения реакции дыхательного фосфорилирования заведомо превалируют над гликолизом и субстратным фосфорилированием в цикле трикарбоновых кислот. Таким образом, настоящий раздел практикума фактически посвящен описанию экспериментальных подходов к изучению метаболизма митохондрий — внутриклеточных органелл, ответственных за дыхательное фосфорилирование.

В качестве объекта исследования во всех задачах используются либо митохондрии из различных тканей, либо их фрагменты, обладающие соответствующим набором ферментативных активностей. Получение интактных митохондрий или их фрагментов, а также выделение некоторых митохондриальных ферментов само по себе представляет небольшое, но требующее тщательности и опыта самостоятельное препаративное исследование. Поэтому получение этих препаратов приведено в «Практикуме» в виде отдельных работ.

Современная биоэнергетика использует весьма разнообразный набор сложных физико-химических методов (электронного парамагнитного резонанса, дифференциальной и двухволновой спектрофотометрии, методов быстрой кинетики и др.), пока недоступный для работы в студенческом практикуме. Приведенные задачи охватывают только минимум экспериментальных приемов и технических средств, свободное владение которыми необходимо любому начинающему научному работнику — биохимику.

1. ПОЛУЧЕНИЕ ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЙ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ

Общие принципы работы при выделении митохондрий. Выделение митохондрий из различных тканей (скелетных мышц, сердца, печени) требует соблюдения следующих условий. *Во-первых, следует тщательно*

но измельчать ткань, почти до гомогенного состояния, так как от этого сильно зависит выход митохондрий. Ткань измельчают ножницами (на чашке Петри) или с помощью мясорубки Латапи, в которой ткань продавливается через отверстия диаметром 1,0—1,5 мм. После этого ее гомогенизируют до получения однородной кашицы. *Во-вторых*, необходимо внимательно контролировать *температурный режим* на всех этапах выделения (0—4° С), так как при его нарушении митохондрии утрачивают ряд своих свойств. Поэтому все процедуры проводят в холодной комнате; все растворы и инструменты должны быть хорошо охлаждены. При охлаждении гомогенизатора пестик необходимо вынуть из стакана, так как стекло и тефлон имеют различные коэффициенты температурного расширения. Структура митохондрий очень чувствительна к замораживанию, поэтому нельзя допускать даже незначительного промерзания растворов во время центрифугирования. *В-третьих*, выделение митохондрий надо *проводить по возможности быстро* и использовать их в работе сразу же.

1. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Реактивы:

1. Среда выделения: 0,1 М КСl, 0,05 М трис-НСl (рН 7,4), 0,001 М MgCl₂. Среду выделения готовят в день опыта. Для этого смешивают концентрированные растворы КСl и MgCl₂, а трис-НСl добавляют в виде навески. Объем раствора доводят до 180 мл, устанавливают рН добавлением сначала 2 н., а затем 1 н. и 0,1 н. НСl, после этого окончательно доводят объемом до 200 мл. КСl и MgCl₂ — химически чистые, перекристаллизованные. Концентрацию основного раствора MgCl₂ определяют титрованием ЭДТА с эриохромом черным Т (с. 484).
2. Сывороточный альбумин — 2%-ный раствор.
3. НСl — 2 н. и 0,1 н. растворы (для доведения рН среды выделения).
4. КОН — 2 н. и 0,1 н. растворы (для доведения рН среды выделения).

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

В три стакана (объемом 100, 50 и 50 мл) наливают по 30 мл среды выделения, охлажденной до 0°С. Среда гомогенизации должна содержать соли, так как в растворе сахарозы или других неэлектролитов миофибриллы желатинируются и плохо разрушаются. Первый стакан (на 100 мл) взвешивают, второй (на 50 мл) помещают в замораживающий холодильник, чтобы в жидкости появились кристаллы льда.

У только что декапитированной крысы быстро вырезают мышцы задних конечностей, стараясь их не повредить, и помещают их в стакан с переохлажденной средой. Через 5 мин мышцы переносят на чашку Петри, освобождают от жира, сухожилий и нервов и помещают в третий стакан (50 мл). После очистки всех кусочков ткани их обсушивают фильтровальной бумагой и тщательно измельчают. Кашицу переносят в первый стакан и определяют чистый вес ткани. Добавляют среду выделения в таком количестве, чтобы общий объем ее в 4 раза превышал объем ткани. Смесь измельчают в гомогенизаторе 1 мин, поднимая и опуская пестик. Гомогенат переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют при 0° С 7 мин при 600 g. Оса-

док, содержащий обломки клеток, ядра и миофибриллы, отбрасывают, надосадочную жидкость центрифугируют 5 мин при 2000 g для более полного удаления миофибрилл. Полученный супернатант фильтруют через 4 слоя марли и центрифугируют 10 мин при 9000 g.

Поверхность полученного осадка митохондрий дважды ополаскивают 2 мл среды выделения для удаления верхнего рыхлого слоя, содержащего примесь саркоплазматического ретикулума. Внутренние стенки стакана осторожно подсушивают фильтровальной бумагой. К осадку добавляют среду выделения из расчета 0,05 мл на 2 г ткани для полярографических исследований или 0,4 мл — для манометрических. Осадок суспендируют с помощью пипетки и переносят в маленький центрифужный стакан, где митохондрии осторожно растирают пестиком до гомогенного состояния.

К суспензии добавляют раствор альбумина до конечной концентрации 0,1% и хранят ее на льду.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Реактивы:

1. KCl — 0,9%-ный раствор (готовят на дистиллированной воде).
2. Сахароза — 0,3 М раствор, содержащий 10^{-2} М ЭДТА (готовят на бидистиллированной воде), рН 7,5.
3. HCl — 1 н. и 0,1 н. растворы.
4. КОН — 1 н. и 0,1 н. растворы.

Для работы используют только что изолированное, не поврежденное сердце крысы, голубя или кролика¹. Сердце быстро переносят в стакан с ледяным раствором 0,9%-ного KCl (около 50 мл), хорошо промывают его и окрашенный кровью раствор сливают. Процедуру повторяют еще дважды, стараясь по возможности полнее отмыть кровь, поскольку эритроциты содержат высокоактивную НАДазу и загрязнение гомогената кровью сказывается на результатах опытов. Отмытое сердце переносят на толстый слой фильтровальной бумаги, обсушивают и ножницами удаляют сосуды, соединительную ткань и жир. Желудочек вскрывают, из внутренней полости удаляют сгустки крови. Ткань еще раз ополаскивают ледяным раствором 0,9%-ным KCl и, обсушив фильтровальной бумагой, помещают в чашку Петри, поставленную на мелко наколотый лед.

Мышцу взвешивают (~5 г) и измельчают ножницами до кашицеобразного (почти гомогенного) состояния. Кашицу переносят в гомогенизатор и добавляют 0,3 М раствора сахарозы с ЭДТА из расчета 10 мл раствора на 1 г сырой ткани. Ткань быстро (не более 1 мин) измельчают в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком до получения однородной массы. Гомогенат переносят в центрифужный стакан и центрифугируют при 600 g в течение 7 мин. С поверхности удаляют жир ватным тампоном и супернатант переносят в другой центрифужный стакан. Процедуру проводят осторожно, чтобы рыхлый слой осадка остался в первом стакане. Супернатант центрифугируют 15 мин при 11000 g. Надосадочную жидкость сливают, плотный осадок митохондрий осторожно растирают стеклянной палочкой в 2 мл раствора сахарозы с ЭДТА до гомогенного состояния. К суспензии добавляют раствор сахарозы с ЭДТА до 40 мл и вновь осаждают мито-

¹ Способы эвтаназии животных обычные (см. с. 221).

хондрии при 11 000 g в течение 15 мин. После удаления супернатанта в стакан добавляют 2 мл раствора сахарозы с ЭДТА, поверхность осадка ополаскивают легким встряхиванием центрифужного стакана. Жидкость сливают, плотный осадок суспендируют в небольшом объеме среды выделения (1,5 мл, концентрация белка 40—60 мг/мл) и хранят в короткой пробирке (длина 3 см) на льду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Умбрейт В. В. и др. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., 1951.
2. Виноградов А. Д. Окисление сукцината и обратный транспорт электронов в дыхательной цепи. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1968.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Реактивы:

1. Среда выделения: 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 0,001 М ЭДТА, рН 7,4.
2. Сахароза — 0,25 М раствор.
3. HCl — 1 н. и 0,1 н. растворы.
4. КОН — 1 н. и 0,1 н. растворы.

Все реактивы готовят на бидистиллированной воде.

Изолированную печень погружают в 30 мл ледяной среды выделения. После двух-трехкратного промывания ткань измельчают ножницами на чашке Петри, стоящей на льду. Кашицу вновь помещают в стаканчик со свежей средой выделения и тщательно промывают. После оседания кусочков ткани на дно жидкость осторожно сливают и промывание повторяют еще дважды. Ткань переносят в гомогенизатор, добавляют 40 мл среды выделения и измельчают в течение 30—40 с. К гомогенату добавляют 40 мл среды выделения, перемешивают медленно вращающимся пестиком и разливают его в два центрифужных стакана. Центрифугируют в течение 10 мин при 0—2° С при 600 g для удаления обломков клеток и ядерной фракции.

Супернатант осторожно сливают и хранят на льду, осадки объединяют и вновь гомогенизируют 20 с в 20 мл среды выделения. Гомогенат центрифугируют при 600 g 10 мин, супернатант объединяют с полученным ранее.

Для осаждения митохондрий объединенный супернатант центрифугируют в двух стаканах при 14 000 g в течение 10 мин. Осадки объединяют в одном стакане и тщательно суспендируют с помощью пипетки на 1 мл в небольшом объеме среды выделения (около 0,5 мл). Маленькими порциями при осторожном встряхивании добавляют 40 мл среды выделения и осаждают митохондрии (14 000 g, 10 мин). Осадок суспендируют в 0,25 М сахарозе, не содержащей ЭДТА, и вновь центрифугируют (14 000 g 10 мин). Супернатант сливают, на полученный осадок митохондрий осторожно наслаивают 0,2—0,3 мл 0,25 М сахарозы. Легким встряхиванием смывают верхний рыхлый слой осадка. Процедуру повторяют еще дважды и полученный плотный осадок митохондрий тщательно суспендируют с помощью пипетки в 0,4—0,5 мл 0,25 М сахарозы. Густую суспензию митохондрий переносят в пробирку и хранят на льду.

ЛИТЕРАТУРА

- Johnson D, Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria//Methods in Enzymology/R. Estabrook, M. Pullman eds. Acad. Press. N. Y.; L., 1967. Vol. 10. P. 94.

II. ПОЛУЧЕНИЕ СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ

1. ПОЛУЧЕНИЕ СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ (ПРЕПАРАТ КЕЙЛИНА—ХАРТРИ)

Хотя интактные митохондрии представляют собой удобный объект для изучения механизмов биоэнергетики, для решения ряда задач используют более простые системы — субмитохондриальные фрагменты. К числу таких задач относится изучение переноса электронов в дыхательной цепи, локализованной во внутренней мембране митохондрий. Существование системы мембран, барьеров проницаемости, системы переноса энергии и др. очень осложняет однозначную интерпретацию кинетики окислительно-восстановительных реакций в интактных митохондриях. В связи с этим были разработаны методы получения более простых препаратов субмитохондриальных частиц. Последние могут быть получены при действии на митохондрии либо детергентов, либо сильных механических воздействий (ультразвук, растирание с песком и т. д.). К числу различных субмитохондриальных фрагментов относится так называемый препарат Кейлина—Хартри, представляющий собой фрагменты внутренней мембраны митохондрий, почти лишенные ферментов цикла Кребса. Препарат имеет полный набор дыхательных переносчиков, обладает высокими активностями НАД·Н и сукцинатоксидазы, стабилен при хранении.

Принцип получения препарата Кейлина—Хартри состоит в экстракции измельченной ткани солевыми буферными растворами, разрушении ее с помощью абразивных материалов и фракционировании центрифугированием.

Реактивы:

1. Фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,4.
2. Фосфатный буфер — 0,2 М раствор, рН 7,4.
3. Фосфатно-боратный буфер, рН 7,4; готовят смешиванием равных объемов растворов: 0,15 М H_3BO_3 и 0,15 М Na_2HPO_4 .
4. HCl — 1 н. и 0,1 н. растворы.
5. KOH — 1 н. и 0,1 н. растворы.

Фосфатный буфер готовят на дистиллированной, а фосфатно-боратный — на бидистиллированной воде.

Препарат получают из сердечной мышцы быка. Сердце очищают от жира, сосудов и соединительной ткани, нарезают кусочками размером 4×4 см и пропускают через мясорубку. Мышечную массу помещают в большой стакан или эмалированную кастрюлю, заливают 10 л холодной водопроводной воды и сильно перемешивают пропеллерной мешалкой в течение 20 мин. После перемешивания воду сливают, оставшуюся массу фильтруют через 4 слоя марли и тщательно отжимают. Описанную процедуру повторяют 5—6 раз. После промывания отжатая мышечная масса имеет слабый желто-розовый цвет. Все дальнейшие процедуры проводят в холодной комнате. Массу заливают 10 л 0,1 М фосфатного буфера, охлажденного до 4° С, и оставляют на 2 ч при непрерывном перемешивании. Экстракт сливают, оставшуюся массу дважды промывают, беря каждый раз по 5 л дистиллированной воды, и сильно отжимают (для этой цели лучше использовать ручной пресс).

хорошо отжаты препарат помещают в большую фарфоровую ступку, добавляют 100 мл 0,02 М фосфатного буфера (рН 7,4) и 100 г кварцевого песка для растирания. Смесь растирают пестиком в течение 1,5 ч до получения гомогенной сметанообразной массы. К ней добавляют 250 мл 0,02 М фосфатного буфера и смесь тщательно размешивают.

Полученный препарат центрифугируют при охлаждении (стаканы на 0,5 л) в течение 30 мин при 2500 об/мин. Супернатант осторожно сливают в большой стакан, не взмучивая осадок, разливают в центрифужные стаканы на 50 мл и центрифугируют при 40 000 *g* (ЦВР—1) в течение 1,5 ч при 1—2° С. Почти прозрачный супернатант сливают. К осадкам добавляют по 2 мл фосфатно-боратного буфера. Смесь суспендируют в стеклянном гомогенизаторе при малой скорости вращения пестика и разливают в пробирки по 3 мл.

Полученные препараты можно хранить при 0° С в течение нескольких дней без заметного снижения сукцинатоксидазной активности.

Примечание. 1. Препарат Кейлина—Хартри можно получать как из свежего, только что взятого материала, так и из замороженной мышцы. В последнем случае НАДН-оксидазная активность полученных препаратов очень невелика, тогда как на сукцинатоксидазную активность замораживание ткани не оказывает существенного влияния.

2. При экстракции ткани фосфатным буфером происходит вымывание не только ферментов цикла Кребса, но и цитохрома *c*, так что высокие оксидазные активности препаратов могут быть получены только при добавлении цитохрома *c* в среду инкубации.

3. Процедура получения может быть прервана на стадии экстракции фосфатным буфером. В этом случае смесь оставляют перемешиваться на ночь.

ЛИТЕРАТУРА

King T. E. Reconstitution of respiratory chain enzyme system. IV. «Cross-reconstitution» of sarcosomal succinate oxidase from soluble succinic dehydrogenase of different species//J. Biol. Chem. 1961. Vol. 236. P. 2342.

2. ПОЛУЧЕНИЕ СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦ ИЗ СЕРДЦА БЫКА

Один из методов получения субмитохондриальных частиц (СМЧ) основан на обработке предварительно выделенных интактных митохондрий ультразвуком. Полученные таким способом СМЧ представляют собой замкнутые везикулы, образованные внутренней мембраной митохондрий. Формирование везикул под действием ультразвука происходит таким образом, что обращенная в матрикс интактных митохондрий поверхность внутренней мембраны становится наружной, обращенной в окружающую среду поверхностью мембраны СМЧ. Такое изменение ориентации мембраны делает СМЧ весьма удобным, а иногда и единственно пригодным объектом для изучения механизма реакций, протекание которых в интактных митохондриях опосредовано (и может контролироваться) трансмембранным переносом веществ. Препараты СМЧ широко используются, в частности, при изучении АТФ-синтетазного комплекса, активный центр которого в этом объекте экспонирован в окружающую среду и свободно доступен для субстратов и продуктов катализируемой им реакции.

Мембрана СМЧ, процедура получения которых описана ниже, характеризуется высокой проницаемостью для ионов H^+ . В связи с этим

такие препараты могут быть использованы для изучения аэробного синтеза АТФ только после специальной обработки. Вместе с тем эти препараты могут быть успешно использованы для кинетического изучения АТФ-гидролазной реакции.

Выделение митохондрий сердца быка

Реактивы и оборудование:

1. Среда для промывания ткани, содержащая 0,9% KCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ трис-HCl (pH 7,8) — 10 л.
2. Трис — 1 М раствор.
3. Среда выделения митохондрий, содержащая 0,25 М сахарозу, 15 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl (pH 7,5) — 5 л.
4. Сахароза — 0,25 М раствор.
5. Стекланный гомогенизатор с тефлоновым пестиком.

Примечание. Среда промывания может быть приготовлена на дистиллированной воде. Все процедуры по выделению проводят при температуре 0—4° С.

Препарат получают из двух бычьих сердец, взятых непосредственно после забоя животных (транспортировка в сумке-холодильнике со льдом, приготовленным из дистиллированной воды).

Очищенные от жира и соединительной ткани мышцы двух сердец пропускают через мясорубку. Измельченную ткань (800 г) несколько раз промывают средой № 1 в стакане объемом 2 л. При промывании необходимо поддерживать pH суспензии на уровне 7,4 раствором 1 М триса (контроль по индикаторной бумаге). Каждый раз промывные воды отфильтровывают через 4 слоя марли.

Когда промывные воды приобретают слабо-розовую окраску, мышечную массу ополаскивают средой выделения и отфильтровывают в последний раз. Затем ее помещают в пластмассовое ведро объемом 4 л, добавляют среду выделения до объема 3500 мл и гомогенизируют ножевым гомогенизатором 3—4 раза по одной минуте с интервалами 30 с; pH гомогената проверяют на pH-метре и в случае необходимости доводят его 1 М раствором триса до 7,4. Гомогенат центрифугируют 15 мин при 1400 g на центрифуге К-70 (2800 об/мин). Предварительно проверив pH (7,4—7,5), полученный супернатант центрифугируют далее 15 мин при 11000 g на центрифуге «Beckman» (ротор JA-14, 9000 об/мин). Супернатант вместе с верхним рыхлым слоем осадка сливают, плотный осадок митохондрий суспендируют в 0,25 М сахарозе при помощи стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком и пересаживают в тех же условиях. Полученные митохондрии суспендируют в 0,25 М сахарозе в гомогенизаторе до конечной концентрации белка 50—60 мг/мл (объем 15—20 мл), замораживают при —20° С и используют в дальнейшем для получения субмитохондриальных частиц.

Получение субмитохондриальных частиц

Реактивы:

1. Среда для суспендирования митохондрий, содержащая 0,15 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА (pH 7,5) — 100 мл.
2. Раствор 1 н. NH_4OH (готовят 10-кратным разведением концентрированного аммиака).

3. Среда для пересадки СМЧ: 0,25 М КСl, 75 мМ сахараза, 30 мМ трис- SO_4 , 2 мМ ЭДТА, рН 8,0.
4. Сахароза — 0,25 М раствор.

Суспензию митохондрий размораживают в бане с водой комнатной температуры и суспендируют в среде № 1 до концентрации белка 20 мг/мл. Значение рН суспензии (стаканчик с суспензией находится в сосуде со льдом) доводят 1 н. раствором NH_4OH до 9,1—9,2. Суспензию обрабатывают на ультразвуковом дезинтеграторе MSE-100 в течение 2 мин (по 1 мин с перерывом в 30 с) при максимальной мощности и постоянном тщательном охлаждении. После этого ее центрифугируют 10 мин при 26 000 *g* на центрифуге «Beckman» (ротор JA-20, 15 000 об/мин) при 0—4°С. Супернатант сливают через марлю в центрифужные стаканы и при той же температуре центрифугируют 20 мин при 200 000 *g* на УЦП-75 (ротор 75, 47 000 об/мин). Осадок СМЧ суспендируют в среде для пересадки и пересаживают в те же условия. Полученные СМЧ гомогенизируют в минимальном объеме 0,25 М сахаразы с помощью стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком, разливают на небольшие порции и замораживают в жидком азоте в полиэтиленовых пробирках.

Примечание. Выход СМЧ из митохондрий ~20% (по белку), АТФазная активность — 1—1,5 мкмоль/мин на 1 мг белка. Препарат может храниться в жидком азоте в течение нескольких месяцев без потери активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crane F. L., Glenn J. L., Green D. E. Studies on the electron transfer system. IV. The electron transfer particles//*Biochim. Biophys. Acta*. 1956. Vol. 22. P. 475.
2. Low H., Vallin J. Succinate—linked diphosphopyridine nucleotides reduction in submitochondrial particles//*Biochim. Biophys. Acta*. 1963. Vol. 69. P. 361.
3. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation//*Biol. Rev.* 1966. Vol. 41. P. 445.
4. Racker E., Horstman L. L. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XIII. Structure and function of submitochondrial particles completely resolved with respect to coupling factor I//*J. Biol. Chem.* 1967. Vol. 242. P. 2547.
5. Klein G., Satre M., Laccari G. et al. Spontaneous aggregation of the mitochondrial natural ATPase inhibitor in salt solution as demonstrated by gel filtration and neutron scattering//*Biochim. Biophys. Acta*. 1982. Vol. 681. P. 226.

3. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Интактные митохондрии представляют собой осмотически активные пузырьки, отделенные от гиалоплазмы (или среды инкубации при эксперименте *in vitro*) двумя мембранами. Таким образом, существуют четыре топологически различных пространства: внешняя мембрана, межмембранное пространство, внутренняя мембрана и внутреннее пространство — матрикс. Ферменты цикла трикарбоновых кислот сосредоточены в матриксе; компоненты дыхательной цепи, транслоказа адениннуклеотидов и АТФ-синтетазный комплекс прочно связаны с внутренней мембраной, в межмембранном пространстве локализована аденилаткиназа, а во внешней мембране — моноаминоксидаза.

Для митохондрий печени разработаны относительно простые способы фракционирования, позволяющие получать очищенные препараты

всех четырех компонентов, а следовательно, дающие возможность устанавливать локализацию того или иного фермента. Описанный ниже метод основан на различиях липидного состава: внешняя мембрана в отличие от внутренней содержит значительные количества холестерина. Последний способен образовывать специфические комплексы с дигитонином — детергентом, сходным по химической структуре с холестерином. Обработка интактных митохондрий в строго контролируемых условиях дозированными количествами дигитонина приводит к разрушению внешней мембраны и вымыванию во внешнюю среду содержимого мембранного пространства. Матрикс, ограниченный внутренней мембраной (митопласты), можно отделить центрифугированием. Супернатант, остающийся после отделения митопластов, подвергается дальнейшему разделению на фракцию внешних мембран и ферментов межмембранного пространства. Внутреннее содержимое митопластов можно перевести в раствор, разрушив последние ультразвуком или подходящим детергентом.

Получение интактных митохондрий из печени крыс

Интактные митохондрии получают из печени (с. 406) 3—4 крыс и густо суспендируют в среде, содержащей 0,25 М сахарозу и 5 мМ трис-НСl (рН 7,4). Определяют белок и к суспензии добавляют бычий сывороточный альбумин (обезжиренный) до конечной концентрации белка 0,5 мг/мл. Готовят раствор дигитонина: 60 мг дигитонина растворяют в небольшой колбочке в 5 мл горячего раствора 0,25 М сахарозы, содержащего 5 мМ трис-НСl (рН 7,4); охлаждают и добавляют бычий сывороточный альбумин до концентрации 0,5 мг/мл.

Небольшую колбу Эрленмейера помещают в сосуд со льдом на магнитную мешалку. В колбу вносят густую суспензию митохондрий и добавляют раствор дигитонина так, чтобы его конечное содержание было 0,16 мг на 1 мг белка митохондрий. Смесь инкубируют на холоде 15 мин при медленном перемешивании, затем разбавляют в 3—5 раз холодным раствором, содержащим 0,25 М сахарозу, 5 мМ трис-НСl, 0,5 мг/мл альбумина и центрифугируют 10 мин при 10 000 g. Супернатант (S_1) сливают, избегая загрязнения рыхлым слоем осадка.

Осадок осторожно суспендируют в 1/2 объема буфера, использованного для разведения (см. выше), переосаждают центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 g и густо суспендируют в том же буфере (митопласты).

К супернатанту (S_1) добавляют KCl и трис-НСl (рН 7,4) так, чтобы их конечные концентрации были 0,12 М и 20 мМ соответственно, после чего его центрифугируют 1 ч при 100 000 g. Осадок (внешние мембраны) суспендируют в небольшом объеме забуференной 0,25 М сахарозы. Супернатант содержит растворимые ферменты межмембранного пространства.

Порцию митопластов (см. выше) разводят в ~5 раз раствором, содержащим 0,12 М KCl, 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), и подвергают ультразвуковой обработке (дезинтегратор MSE или УЗДН-1, при максимальной акустической мощности и постоянном охлаждении) три раза по 30 с с интервалами 2—3 мин. Суспензию центрифугируют 1 ч при 100 000 g. Осадок (внутренние мембраны) суспендируют в небольшом объеме забуференной сахарозы. Супернатант содержит растворимые ферменты матрикса.

В качестве маркерных ферментов в полученных фракциях измеряют активности: цитохромоксидазы (специфическая локализация —

внутренняя мембрана митохондрий), ротенон-нечувствительной НАДН:цитохром *c*-редуктазы (специфическая локализация — внешняя мембрана), малатдегидрогеназы (специфическая локализация — матрикс) и аденилаткиназы (специфическая локализация — межмембранное пространство).

Измерение цитохромоксидазной активности

В кювету полярографа, заполненную средой, содержащей 0,125 М сахарозу, 60 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, 0,1 мМ 2,4-динитрофенол и 40 мкМ цитохром *c*, вносят суспензию либо интактных митохондрий, либо митопластов, либо интактных митохондрий, разрушенных детергентом (конечное содержание белка в кювете полярографа ~0,5—1 мг/мл). Митохондрии, разрушенные детергентом, готовят, смешивая равные объемы густой суспензии митохондрий и 2%-ного раствора детергента твин-80. Смесь взбалтывают 2—3 мин и помещают на лед. Реакцию начинают добавлением нейтрализованной (рН 7,4) аскорбиновой кислоты (конечная концентрация 10 мМ). Регистрируют постоянное во времени поглощение кислорода и рассчитывают активность цитохромоксидазы в микроэлектронэквивалентах за 1 мин в расчете на 1 мг белка препарата.

При хорошо проведенном фракционировании удельные активности митопластов и митохондрий, разрушенных детергентом, примерно равны, а удельная активность интактных митохондрий составляет не более 10% от этой величины. В препаратах внешних мембран, матрикса и межмембранного пространства обнаруживаются лишь следовые количества цитохромоксидазы.

Измерение активности ротенон-нечувствительной НАДН:цитохром *c*-редуктазы

Кюветы спектрофотометра заполняют средой, содержащей: фосфатный буфер (рН 7,4), 1 мМ KCN, 1 мкМ ротенон, 1,5 мМ НАДН, 10—20 мкМ цитохром *c*. Устанавливают длину волны 550 нм (точно!). Для этого кювету помещают в кюветное отделение, устанавливают длину волны по шкале прибора на отметке 550 нм и добавляют к среде нейтрализованный (рН 7,4) раствор аскорбиновой кислоты (конечная концентрация — 5—10 мМ). Цитохром *c* немедленно восстанавливается, и раствор меняет цвет от красновато-оранжевого до ярко-розового. Устанавливают шкалу длин волн на 550 нм по максимальному поглощению раствора восстановленного цитохрома *c*, при дальнейшей работе установку длин волн не меняют. Реакцию начинают внесением препаратов в кювету, содержащую окисленный цитохром *c*, и регистрируют увеличение поглощения при 550 нм. Рассчитывают удельную активность препаратов в микроэлектронэквивалентах за 1 мин в расчете на 1 мг белка. Коэффициент миллимолярной экстинкции для цитохрома *c*: $A_{550}^{red} - A_{550}^{ox} = 19$. Активность фермента, характерного для внешней мембраны, определяют по разнице скоростей реакций в присутствии и в отсутствие ротенона.

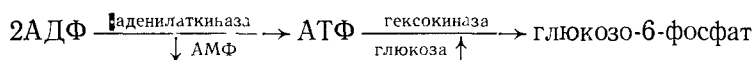
Измерение активности малатдегидрогеназы

Кюветы спектрофотометра заполняют средой, содержащей 60 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl и НАДН так, чтобы поглощение среды при 340 нм не превышало 1 ед. оптической плотности. К среде добавляют

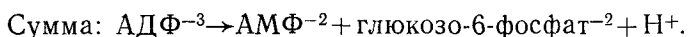
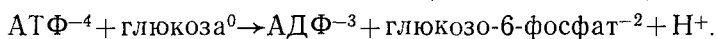
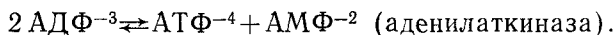
препарат исследуемой фракции (несколько десятков микролитров). При измерении активности суспензии препарат «растворяют» неионным детергентом тритон X-100, так как неспецифическое рассеивание света в ультрафиолетовой части спектра весьма значительно. Реакцию начинают добавлением в опытную кювету свежеприготовленного нейтрализованного бикарбонатом раствора щавелевоуксусной кислоты — конечная концентрация в кювете 20 мкМ (*малатдегидрогеназа тормозится избытком оксалоацетата!*). Регистрируют начальные скорости реакций и рассчитывают удельную активность в микромолях восстановленного оксалоацетата (окисленного НАДН) за 1 мин на 1 мг белка.

Измерение активности аденилаткиназы (миокиназы)

Активность фермента легко может быть прослежена в сопряженной системе:



В присутствии избытка гексокиназы фосфорильный остаток одной из молекул АДФ оказывается перенесенным на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата. В приведенном ниже простом методе регистрации аденилаткиназной активности использовано различие в ионизации субстратов и продуктов реакции. При рН 8,0 сопряженная система реакций может быть записана так:



В слабозабуференной среде суммарная реакция сопровождается появлением одного иона H^+ на 1 моль превращенного АДФ. Небольшое закисление среды может быть зарегистрировано с помощью чувствительного регистрирующего рН-метра.

Кювету регистрирующего рН-метра заполняют средой, содержащей 2 мМ трис-НСl, 0,1 М KCl, 50 мкМ ЭДТА, 5 мМ MgCl_2 , 20 мМ глюкозу и 2 мМ АДФ (рН 8,0). Показания прибора калибруют, внося в кювету титрованный раствор HCl. Устанавливают чувствительность прибора так, чтобы внесение 100 мкМ HCl (конечная концентрация) вызывало ~90%-ный ответ пера потенциометра. Подбирают требуемое количество гексокиназы. Для этого в кювету вносят известное количество АТФ (50 мкМ) и добавляют такое количество гексокиназы, которое обеспечивает закисление среды с $\tau_{1/2} \sim 5$ с.

Заполнив опытную кювету указанным выше раствором, добавляют требуемое количество гексокиназы и реакцию начинают внесением исследуемого препарата (митохондрии, митопласты, супернатант S_2 , внешние мембраны). Реакцию регистрируют 1—2 мин, чувствительность прибора калибруют внесением титрованного раствора HCl и рассчитывают удельную активность в микромолях АДФ, превращенного за 1 мин в расчете на 1 мг белка.

Студентам предлагается самостоятельно выполнить следующие работы:

1. Солюбилизация внешней и внутренней мембраны митохондрий различными ионными и неионными детергентами.
2. Сравнение эффективностей окислительного фосфорилирования, катализируемого интактными митохондриями и митопластами.

3. Сравнение эффективности АМФ в качестве акцептора фосфата в интактных митохондриях и митопластах.
4. Сравнение сукцинат: цитохром *c*-редуктазных активностей интактных митохондрий, митопластов и препаратов внутренних мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рэкер Э. Мембраны митохондрий//Молекулы и клетки/Под ред. Г. М. Франка. М., 1969. Вып. 4. С. 150.
2. Кагава Я. Биомембраны. М., 1985.
3. Schnaitman C., Greenwalt J. W. Enzymatic properties of the inner and outer membrane of rat liver mitochondria//J. Cell. Biol. 1968. Vol. 38. P. 158.

III. ПОЛУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ И РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

Дыхательная цепь представляет собой полиферментный липопротеидный ансамбль, осуществляющий НАДН:- и сукцинат: кислород-оксиредуктазные реакции. В состав дыхательной цепи входят флавопротеиды, железо-серные негемовые белки, убихинон и убихинон-связывающие белки, цитохромы и медьсодержащие белки, представленные примерно 45 индивидуальными полипептидами, а также фосфолипиды (~0,4 мг/мг белка). В интактных митохондриях все компоненты дыхательной цепи прочно связаны с их внутренней мембраной. Для перевода в «растворимое» (мелкодисперсное) состояние всех компонентов дыхательной цепи, кроме цитохрома *c*, приходится прибегать к «жестким» воздействиям — применению органических растворителей (этанола, бутанола), детергентов (холата, дезоксихолата, тритона X-100, алкилгликозидов), хаотропных агентов (перхлоратов, тиоцианатов, трихлорацетата) или экстремальных значений pH. Дальнейшее фракционирование солюбилизированных препаратов, например высаливанием из растворов, содержащих детергент, зачастую представляет собой скорее эмпирически найденные искусные приемы, чем четко описываемый в терминах физической химии контролируемый процесс.

При работе с изолированными компонентами дыхательной цепи отсутствуют четкие функциональные критерии очистки (общая и удельная активности). Любой компонент дыхательной цепи (кроме первых, реагирующих с НАДН или сукцинатом, и последнего, реагирующего с кислородом) катализирует бисубстратную реакцию, в которой в качестве субстрата-донора и субстрата-акцептора электронов участвуют белки, не полученные в индивидуальном состоянии. В такой ситуации единственным строгим критерием активности компонента, полученного в результате фракционирования, может служить реконструкция. Для ее осуществления в идеальном случае необходимо было бы иметь, во-первых, препарат внутренних мембран митохондрий, специфически и полностью лишенный одного из компонентов, и, во-вторых, «растворимый» очищенный препарат этого компонента. Смешивание этих препаратов в этом случае должно приводить к появлению сукцинат-, или НАДН-оксидазной активностей, количественно соответствующих исходному «нативному» препарату дыхательной цепи. К сожалению, такая реконструкция в настоящее время осуществлена лишь в отношении цитохрома *c* и частично — сукцинатдегидрогеназы. Стандартным подходом, сыгравшим главную роль во фракционировании дыхательной

цепи, служит использование искусственных доноров и акцепторов в качестве субстратов реакции.

В сильно упрощенном виде, следуя терминологии школы Д. Грина, дыхательную цепь можно представить в виде четырех относительно независимых комплексов: I — НАДН: убихинон-оксидоредуктаза, II — сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза; III — убихинол: цитохром *c*-оксидоредуктаза, IV—цитохром *c*: O_2 -оксидоредуктаза, объединяемых функционально чрезвычайно липофильным убихиноном и весьма гид-

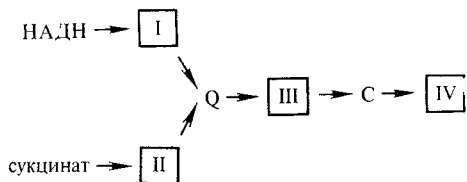


Рис. 48. Четыре комплекса цепи переноса электронов в митохондриях

рофильным цитохромом *c* (рис. 48). Каждый из комплексов, в свою очередь, состоит из нескольких оксидоредуктаз, часть которых получена в гомогенном состоянии. Такое строение дыхательной цепи фактически предложено на основании работ по фракционированию ее на отдельные компоненты. Остается неизвестным, всегда ли отдельные компоненты комплекса в мембране нативных митохондрий функционируют в виде надмолекулярного структурного объединения.

Ниже приведены методы получения всех четырех комплексов. В качестве исходного материала (нативная дыхательная цепь) могут быть использованы либо ультразвуковые субмитохондриальные фрагменты, либо препарат Кейлина—Хартри (с. 407).

1. ОТДЕЛЕНИЕ И РЕКОНСТРУКЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ (СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА)

Сукцинатоксидазная система интактных митохондрий состоит по крайней мере из шести индивидуальных компонентов — переносчиков электронов: флавопротеида, кофермента Q_{10} (Ко Q), цитохромов *b*, *c*₁, *c* и цитохромоксидазы. В 40-х годах Кейлину удалось показать, что при обработке субмитохондриальных фрагментов щелочью происходит необратимая потеря сукцинатоксидазной активности, тогда как цитохромоксидазная активность в этих условиях остается практически неизменной. Эти эксперименты положили начало серии исследований, в результате которых были осуществлены выделение растворимой сукцинатдегидрогеназы и реконструкция сукцинатдегидрогеназной системы из дегидрогеназы и мембран, содержащих кофермент Q и цитохромы.

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1) принадлежит к типичным ферментам, прочно связанным с внутренней мембраной митохондрий. Сукцинатдегидрогеназа, способная к реконструкции, представляет собой белок (м. м. ок. 100 000 Да), содержащий в своем составе флави-надениндинуклеотид, ковалентно связанный с полипептидом, 8γ-атомов негемового железа и 8γ-моль сульфида, освобождающегося при подкислении среды. Белок катализирует окисление сукцината искусственны-

ми акцепторами электронов (феррицианидом, феназинметосульфатом, тетраметил-*n*-фенилендиамином) со скоростями, соизмеримыми с сукцинатоксидазной реакцией. Дегидрогеназная активность фермента и его способность к реконструкции весьма неустойчивы. Будучи связана с мембранами, сукцинатдегидрогеназа стабильна во времени. Решающим фактором, определяющим высокую нестабильность растворимого фермента, является появление чувствительности к кислороду. Поэтому для получения способной к реконструкции сукцинатдегидрогеназы необходимо тщательно избегать контакта растворимого фермента с кислородом.

В настоящей работе предлагается получить частично очищенный препарат сукцинатдегидрогеназы и провести реконструкцию сукцинатоксидазы из растворимого фермента и мембран митохондрий, лишенных дегидрогеназной активности.

Реактивы:

1. Реактивы, необходимые для выделения препарата Кейлина—Хартри (с. 407).
2. Препарат Кейлина—Хартри, суспендированный в 50 мМ фосфатно-боратном буфере (концентрация белка около 10 мг/мл).
3. Сукцинат калия — 0,6 М раствор, рН 7,8.
4. *n*-Бутанол, охлажденный до -15°C .
5. Фосфатный буфер — 0,1 М раствор, рН 7,8.
6. Гель фосфата кальция (постаревший).
7. Уксусная кислота — 2 н. раствор.
8. Феррицианид калия — $2 \cdot 10^{-2}$ М раствор.
9. Раствор цитохрома *c* — 1 мг/мл.
10. Раствор бычьего сывороточного альбумина — 10 мг/мл.
11. HCl — 1 н. и 0,1 н. растворы.
12. KOH — 1 н. и 0,1 н. растворы.

Получение растворимой сукцинатдегидрогеназы. К 46 мл препарата Кейлина—Хартри (с. 407) добавляют 4 мл 0,6 М сукцината калия, суспензию деаэрируют продуванием азота в течение 15—20 мин. Колбу плотно закрывают и оставляют стоять на ночь при 0°C . На следующий день суспензию продувают азотом в течение 15—20 мин, доводят рН под слабым током азота до 9,35 (пользуются 1 н. KOH) и переносят в двухгорлую колбу, снабженную трубкой для пропуска азота (рис. 49).

Непосредственно перед работой проверяют рН-метр по стандартным буферным растворам. Включают магнитную мешалку, ток азота и из делительной воронки по каплям добавляют 10 мл деаэрированного и охлажденного до -15°C *n*-бутанола. По окончании делительную воронку закрывают и продолжают перемешивание в анаэробной атмосфере в течение 20—30 мин. Смесь переносят в два центрифужных стакана с крышками, уравнивают, продувают азотом и центрифугируют 30 мин при 10 000 об/мин в центрифуге ЦВР при 0°C .

После центрифугирования смесь разделяется на 4 слоя: небольшой осадок, водный слой, плотный слой денатурированного белка и небольшой слой избытка нерастворившегося бутанола. Водный слой с помощью шприца переносят в мерный цилиндр, измеряют объем и переносят в химический стакан (под ток азота); рН раствора доводят деаэрированной 2 н. уксусной кислотой до 6,0. При отделении вод-

ного слоя необходимо тщательно следить, чтобы он не окислялся и не загрязнялся другими фракциями.

К раствору добавляют гель фосфата кальция (деаэрированный) из расчета 4 мг сухого веса геля на 1 мл раствора и суспензию перемешивают под током азота 10 мин. Смесь центрифугируют в закрытых

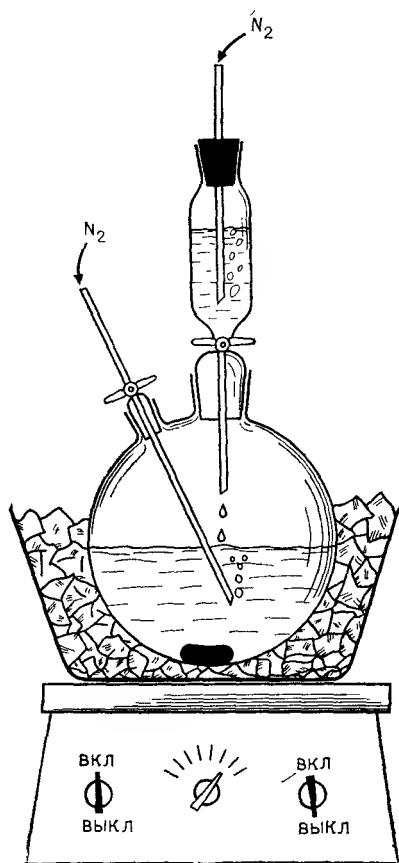


Рис. 49. Установка для солюбилизации сукцинатдегидрогеназы

стаканах 15 мин при 15 000 об/мин в центрифуге ЦВР. Осадок переносят в плотно закрывающуюся колбу, добавляют 20 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,8. В колбу помещают мешалку, продувают азотом, закрывают, хорошо перемешивают до полной гомогенности суспензии. Смесь центрифугируют 15 мин в закрытом стакане при 5000 об/мин в центрифуге ЦВР. Полученный желтый прозрачный супернатант представляет собой раствор частично очищенной сукцинатдегидрогеназы. Раствор оставляют под слабым током азота при 0° С и используют сразу после получения.

Приготовление субмитохондриальных частиц, лишенных сукцинатдегидрогеназы. К 10 мл суспензии препарата Кейлина—Хартри осторожно при комнатной температуре добавляют 1 н. КОН до pH 9,3.

60 мин, затем охлаждают до комнатной температуры и доводят pH до 7,8 осторожным добавлением 2 н. уксусной кислоты. Добавляют 25 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,8) и центрифугируют при 0° С в центрифуге ЦВР при 18 000 об/мин в течение 30 мин. Осадок суспендируют в 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,8) и хранят при 0° С. Препарат готовят накануне проведения опытов по реконструкции.

Реконструкция сукцинатоксидазы. В полярографической кювете объемом 2 мл составляют смесь, содержащую в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,8) 3—5 мг частиц белка, приготовленных, как указано выше, 100 мкг цитохрома с 10 мМ сукцинат. Электроды полярографа погружают в кювету и убеждаются в отсутствии потребления кислорода. Добавляют около 0,1 мл раствора фермента (сукцинатдегидрогеназы) и регистрируют поглощение кислорода. Образующаяся в процессе реконструкции сукцинатоксидаза обладает всеми свойствами нативной системы. Пользуясь приемами, описанными на с. 436, определяют чувствительность сукцинатоксидазы к ингибиторам транспорта электронов. В контрольных экспериментах убеждаются в отсутствии сукцинатоксидазной активности растворимого фермента.

Измерение сукцинатдегидрогеназной активности. В кювете спектрофотометра составляют смесь, состоящую из 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,8), 10 мМ сукцината, бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл) и 2 мМ феррицианида калия. Регистрируют оптическую плотность при 420 нм (коэффициент молярной экстинкции феррицианида равен $1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). В кювету добавляют раствор фермента (около 0,1 мл) и регистрируют сукцинат:феррицианид-редуктазную активность, отмечая показания спектрофотометра через каждые 30 с.

Студентам предлагается самостоятельно провести следующие работы:

1. Сравнение числа оборотов сукцинатдегидрогеназы в реконструированной системе и в изолированном состоянии.
2. Сравнение чувствительности нативной и растворимой сукцинатдегидрогеназы к ингибиторам дыхания.
3. Сравнение стабильности растворимого фермента в отношении реконструкции и реакции с искусственными акцепторами электронов (феррицианид).

ЛИТЕРАТУРА

1. King T. E. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase//Methods in Enzymology/R. Estabrook, M. Pullman eds. N. Y.: L., 1976. Vol. 10. P. 322.
2. King T. E. Reconstitution of the respiratory chain//Adv. in Enzymol. 1966. Vol. 28. P. 155.
3. Singer T. P., Kearney E. B., Kenney W. C. Succinate dehydrogenase//Adv. in Enzymol. 1973. Vol. 37. P. 189.
4. Виноградов А. Д., Зимакова Н. И. Сукцинатдегидрогеназа//Структура и функция ферментов. М., 1973. Вып. II. С. 3.

2. ОТДЕЛЕНИЕ И РЕКОНСТРУКЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ (ЦИТОХРОМ c)

Перенос электронов и водорода от субстратов цикла трикарбоновых кислот осуществляется совокупностью ферментов и коферментов, локализованных в митохондриях. Большинство дыхательных переносчиков прочно связано с мембранами митохондрий и не отделяется от

них при обычных методах экстракции. Однако некоторые компоненты хорошо растворимы в водной среде и с помощью специальных приемов могут быть отделены от митохондрий. К ним относятся никотинамидные коферменты и низкомолекулярный белок (м. м. = 13 000 Да) — цитохром *c*. Считают, что цитохром *c* локализован в пространстве между внешней и внутренней мембраной митохондрий.

Существует несколько способов отделения цитохрома *c* от митохондрий. Принцип всех этих методов состоит в разрушении внешней мембраны митохондрий с помощью детергентов или гипотонической обработки и экстракции белка солевыми растворами. В настоящей задаче предлагается экстрагировать цитохром *c* из митохондрий, убедиться в снижении оксидазной активности экстрагированных препаратов и активировать дыхание добавлением цитохрома *c*. В качестве объекта исследования используются митохондрии печени крысы (получение см. выше). Схематически процесс отделения цитохрома *c* изображен на рис. 50.

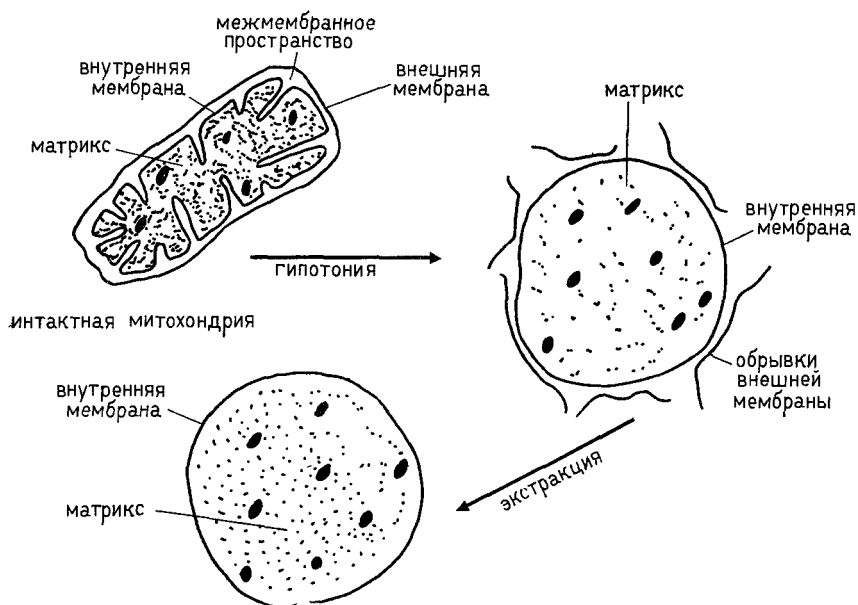


Рис. 50. Схема отделения цитохрома *c* от митохондрий

Так как внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для растворенных в матриксе веществ, гипотоническая обработка приводит к набуханию матрикса, что сопровождается разрывом внешней мембраны. При этом свободный цитохром *c* выходит в окружающую среду, а адсорбированный может быть легко удален экстракцией солевым раствором.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрии печени крысы.
2. Сахароза — 0,3 М раствор.
3. KCl — 0,15 и 0,015 М растворы.

4. Сукцинат калия — 0,3 М раствор, рН 7,4.
5. Глутамат калия — 0,5 М раствор, рН 7,4.
6. 2,4-динитрофенол — 0,005 М раствор, рН 7,4.
7. Среда инкубации: 0,15 М сахаразы, 0,075 М KCl, 0,01 М фосфат калия, рН 7,4.
8. Раствор цитохрома с — 1 мг/мл, готовится непосредственно перед опытом.
9. Реактивы для определения белка (с. 483).

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

Изолированные митохондрии печени крысы суспендируют в 3 мл 0,3 М раствора сахаразы. Три конические колбы заполняют 40 мл растворов: 0,3 М сахаразы (1), 0,15 М KCl (2) и 0,015 М KCl (3) — и в каждую добавляют по 1 мл густой суспензии митохондрий. Содержимое всех колб осторожно перемешивают в течение 10 мин при 0° С и затем переносят в три центрифужных стакана на 50 мл. Митохондрии отделяют центрифугированием при 10 000 g, суспендируют в 0,5 мл 0,15 М раствора KCl и переносят в три колбы, содержащие по 40 мл KCl той же концентрации. Содержимое колб вновь перемешивают на холоде в течение 10 мин и центрифугируют повторно при тех же условиях для отделения митохондрий. Полученные осадки митохондрий суспендируют в 0,3—0,5 мл 0,3 М раствора сахаразы и используют в опытах.

Скорости потребления кислорода определяют полярографически (с. 480), используя в качестве субстратов сукцинат и глутамат. Ячейку полярографа заполняют 2 мл среды инкубации (см. выше), погружают электроды и в реакционную смесь вносят 0,08—0,10 мл густой суспензии митохондрий. Через 1 мин добавляют в смесь субстрат окисления (5 мМ) и через 1—2 мин вносят динитрофенол (50—100 мкМ). Каждую пробу повторяют дважды. Рассчитанные скорости дыхания представляют в виде таблицы:

Обработка препарата	Скорость потребления кислорода, мккатом O ₂ /мин/мг белка			
	сукцинат		глутамат	
	—ДНФ	+ДНФ	—ДНФ	+ДНФ
0,3 М сахараза (дважды)				
0,15 М KCl (дважды)				
0,015 М KCl				
0,15 М KCl				

Для препарата, промытого гипотоническим раствором KCl, определяют зависимость скорости окисления сукцината от количества добавленного в среду инкубации цитохрома с: измеряют сукцинатоксидазную активность, как описано выше, но в пробы добавляют цитохром с в концентрациях от 0 до 100 мкг/2 мл (5—6 точек). Полученные результаты представляют в виде графика.

Примечания. 1. Измерение скорости потребления кислорода можно проводить манометрически в той же среде инкубации. Заполнение соудиков и технику работы см. на с. 10.

2. После получения исследуемых препаратов из каждой суспензии отбирают по 0,05 мл для определения белка с биуретовым реактивом (с. 483).

1. Ленинджер А. Митохондрия. М., 1968.
2. Jacobs E. E., Sanadi D. R. The reversible removal of cytochrome *c* from mitochondria//J. Biol. Chem. 1960. Vol. 235. P. 531.

3. ОТДЕЛЕНИЕ И РЕКОНСТРУКЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ (НА ПРИМЕРЕ КОЭНЗИМА Q)

Одним из компонентов дыхательной цепи митохондрий является коэнзим Q, или убихинон. Это соединение способно к редокс-превращениям и присутствует в митохондриях в количествах, более чем на порядок превышающих содержание ферментов дыхательной цепи. Коэнзим Q акцептирует электроны от дегидрогеназ, локализованных во внутренней мембране митохондрий (сукцинат- и НАДН-дегидрогеназы), и передает их комплексу III (с. 415). Согласно хемиосмотической гипотезе Митчела, в процессе редокс-превращений коэнзим Q осуществляет векторный перенос протонов через мембрану в так называемом «Q-цикле». Реакция переноса электронов и протонов с участием коэнзима Q в комплексе III сопровождается высвобождением энергии, достаточной для синтеза одной молекулы АТФ.

В системе доказательств обязательного участия коэнзима в дыхательной цепи важную роль играют эксперименты по экстракции его из внутренней мембраны митохондрий различными органическими растворителями (циклогексаном, пентаном, ацетоном и др.). Такая обработка приводит к полному ингибированию переноса электронов от дегидрогеназ к молекулярному кислороду, но не сказывается на каталитической активности собственно дегидрогеназ, цитохромов и цитохромоксидазы. Реконструкция коэнзима Q в состав препарата СМЧ, специфически лишенных убихинона, приводит к полному восстановлению утраченных функций.

В настоящей работе предлагается специфически удалить коэнзим Q из препарата субмитохондриальных частиц, убедиться в том, что при этом тормозится сукцинатоксидазная активность частиц и не происходит повреждения собственно сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, а затем реконструировать сукцинатдегидрогеназную активность добавлением к экстрагированным препаратам убихинона или его гомологов.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для получения препарата Кейлина—Хартри (с. 407).
2. KCl — 0,15 М раствор.
3. *n*-Пентан.
4. Сахароза — 0,25 М раствор.
5. Этиловый спирт (перегнанный).
6. Фосфат калия — 0,1 М раствор, pH 7,6.
7. Цитохром *c* — 2 мМ раствор.
8. Сукцинат калия — 1 М раствор.
9. ТМФД (тетраметил-*n*-фенилендиамин) — 0,01 М раствор.
10. Полярограф с набором кювет и микропипеток.

Выделяют препарат Кейлина—Хартри (см. с. 407). 100 мл препарата, суспендированного в 0,15 М KCl в концентрации 20 мг/мл, замо-

раживают в жидком азоте и высушивают в течение 18 ч на лиофильной сушке до постоянного веса. Одну пятую часть (по весу) полученных лиофилизированных частиц помещают в эксикатор и хранят при -20°C . Оставшиеся частицы подвергают дальнейшей обработке.

Получение препарата, специфически лишенного коэнзима Q. Лиофилизированные частицы осторожно суспендируют с помощью гомогенизатора Поттера в 50 мл *n*-пентана, суспензию переносят в колбу со шлифом и встряхивают в течение 5 мин при 0°C , затем центрифугируют при 1300 *g* в течение 10 мин. Экстракцию пентаном Q повторяют 5 раз. Обычно таким способом удаляется 3—6 мкмоль коэнзима Q из 1 мг СМЧ. Полученный экстракт коэнзима Q (250 мл) выпаривают на роторном испарителе до объема 2 мл. После экстракции частицы сушат в роторном испарителе до полного удаления пентана в течение 1 ч при комнатной температуре и хранят в эксикаторе при -20°C .

Реконструкция сукцинатдегидрогеназной активности. Частицы, дефицитные по коэнзиму Q (около 200 мг), суспендируют в стеклянном гомогенизаторе в небольшом объеме (1—2 мл) концентрированного пентанового экстракта (см. выше), содержащего около 40 мкмоль коэнзима Q на 1 мг белка частиц. Суспензию встряхивают в течение 30 мин при 0°C , а затем центрифугируют 10 мин при 1300 *g*. Осадок осторожно ополаскивают 1 мл охлажденного пентана. Полученный препарат реконструированных частиц высушивают в роторном испарителе до полного удаления пентана. В день опыта частицы трех типов (лиофилизированные, экстрагированные пентаном и «реконструированные») гомогенизируют в 0,25 М сахарозе (концентрация белка 30—40 мг/мл), из каждого препарата отбирают по 0,05 мл суспензии для определения белка с биуретовым реактивом.

Определение концентрации коэнзима Q в пентановом экстракте.

В кювету спектрофотометра помещают 2 мл этилового спирта и 40 мкл концентрированного пентанового экстракта, перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора при 275 и 290 нм. Рассчитывают концентрацию коэнзима Q в экстракте (разность коэффициентов молярной экстинкции коэнзима Q при 275 и 290 нм равна $12\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), а также количество коэнзима Q, экстрагированного из 1 мг частиц.

Измерение сукцинатоксидазных активностей полученных препаратов частиц. Для измерения сукцинатоксидазной активности пользуются полярографическим методом (с. 480). Кювету полярографа заполняют 2 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,6), добавляют 0,02 мл раствора цитохрома *c*. После погружения электродов включают регистрирующий прибор и устанавливают исходное значение электрического тока. Затем в кювету добавляют 0,05—0,1 мл лиофилизированного препарата Кейлина—Хартри и реакцию начинают добавлением 0,02 мл раствора 1 М сукцината калия. Аналогичным образом измеряют сукцинатоксидазную активность препарата частиц, специфически лишенного коэнзима Q. Убедившись в том, что активность таких частиц существенно снижена, в кювету добавляют 100 мкМ ТМФД. Дыхание резко активируется, так как ТМФД обеспечивает перенос электронов от сукцинатдегидрогеназы непосредственно на цитохромоксидный участок дыхательной цепи. В следующей пробе проводят измерение сукцинатоксидазной активности реконструированного препарата частиц.

Рассчитывают скорости сукцинатоксидазных активностей трех препаратов СМЧ.

1. Ernster L., Lee I.-Y., Norling B. et al. Studies with ubiquinone-depleted sub-mitochondrial particles. Essentiality of ubiquinone for the interaction of succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, and cytochrome *b*//Europ. J. Biochem. 1969. Vol. 9. P. 299.
2. Szarkowska L. The respiration of DPNH oxidase activity by coenzyme Q (ubiquinone)//Arch. Biochem. Biophys. 1969. Vol. 113. P. 519.
3. Ernster L., Glaser E., Norling B. Extraction and reincorporation of ubiquinone in submitochondrial particles//Methods in Enzymology/S. Fleisher, L. Packer eds. N. Y., 1978. Vol. LIII. P. 573.
4. Gutman M. Electron flux through the mitochondrial ubiquinone//Biochim. Biophys. Acta. 1980. Vol. 594. P. 53.
5. Trumpower B. L. New concept on the role of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain//J. Bioenerg. Biomembranes. 1981. Vol. 13. P. 1.

4. ПОЛУЧЕНИЕ СУКЦИНАТ:УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ (КОМПЛЕКС II)

Сукцинат:убихинон-редуктаза (СУР) катализирует окисление сукцината убихиноном. По данным электрофореза, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия фермент состоит из 3—4 полипептидов. Субъединицы с молекулярными массами 70 000 и 28 000 Да представляют собой собственно сукцинатдегидрогеназу, в субстратсвязывающем центре которой происходит дегидрирование сукцината; низкомолекулярные компоненты комплекса II (м.м. ок. 15 000 Да) придают сукцинатдегидрогеназе реактивность по отношению к убихинону, чувствительность к специфическим ингибиторам и, по-видимому, принимают участие в связывании фермента с мембраной. Выделение препарата СУР основано на экстракции фермента из мембраны с помощью неионного детергента тритона X-100 и концентрировании препарата охлажденным ацетоном. Дальнейшее фракционирование сульфатом аммония и очистка на кальций-фосфатном геле позволяют получить фермент в высокоочищенном состоянии с каталитической активностью около 25 мкмоль окисленного сукцината в 1 мин на 1 мг белка.

Реактивы:

1. Реактивы для получения препарата Кейлина —Хартри (с. 407).
2. Сахароза — 0,25 М раствор.
3. Сукцинат натрия — 1 М раствор.
4. Холат натрия — 20%-ный раствор (рН 7,8).
5. Тритон X-100 — 10%-ный раствор.
6. Ацетон.
7. Буфер I, содержащий 0,1 М фосфат натрия (рН 7,5) и 4 мМ ЭДТА (готовят в день выделения).
8. Буфер II, содержащий 4 М мочевины, 0,1 М фосфат натрия (рН 7,5) и 4 мМ ЭДТА.
9. Буфер III, содержащий 0,1 М фосфат натрия (рН 7,8), 20 мМ сукцинат натрия и 0,2 мМ ЭДТА.
10. Буфер IV, содержащий 20 мМ трис-сульфат (рН 7,5) 20 мМ сукцинат натрия и 0,2 мМ ЭДТА.
11. Буфер V, содержащий 20 мМ фосфат натрия (рН 7,8), 20 мМ сукцинат натрия, 0,2 мМ ЭДТА и 0,1%-ный тритон X-100.
12. Буфер VI, содержащий 20 мМ фосфат калия (рН 7,8), 20 мМ малонат калия, 0,2 М ЭДТА (обязательно калиевая соль) и 0,1%-ный тритон X-100.

13. Буфер VII, содержащий 20 мМ фосфат натрия (рН 7,4) и 0,2 мМ ЭДТА.
14. Кальций-фосфатный гель (см. приготовление на с. 114).
15. Малонат калия — 20 мМ раствор, содержащий 0,2 мМ ЭДТА (обязательно калиевая соль) и 0,1%-ный тритон X-100
16. Среда измерения активности, содержащая 20 мМ фосфат натрия (рН 7,8), 20 мМ сукцинат натрия, 0,2 мМ ЭДТА и 0,004%-ный тритон X-100.
17. Синий Вурстера, СВ (свободный катион-радикал тетраметил-парафенилендиамина) — 3 мМ раствор (готовят в день опыта)
18. Q_2 — 5 мМ раствор, приготовленный на перегнанном этаноле
19. Уксусная кислота — 1 М раствор.
20. NaOH — 1 М раствор.
21. Аммиак — концентрированный раствор.
22. Сульфат аммония — кристаллический.
23. Теноилтрифторацетон (ТТА) — 20 мМ раствор, приготовленный на перегнанном этаноле.

Выделяют препарат Кейлина—Хартри из двух сердец быка (с. 407). Препарат тщательно суспендируют в 0,25 М сахарозе и доводят содержание белка до 40 мг/мл, замораживают при -20°C . Все процедуры выделения проводят при температуре $0-4^{\circ}\text{C}$. В стакане на 0,5 л к 75 мл замороженного и тщательно суспендированного препарата добавляют буфер I до суммарного объема 120 мл и 5 мл 1 М сукцината натрия. Смесь инкубируют 20 мин. Затем при хорошем перемешивании по каплям из делительной воронки добавляют 125 мл 4 М раствора мочевины, приготовленного на буфере II. Смесь инкубируют 30 мин, в конце инкубации разводят в 2 раза буфером III, рН смеси доводят до 6,0 с помощью 1 М CH_3COOH и центрифугируют при 22 000 g в течение 90 мин. Желтый, мутноватый супернатант отбрасывают, осадок гомогенизируют в буфере IV, разводят до 250 мл и снова центрифугируют² 50 мин. Полученный осадок гомогенизируют в 50 мл буфера IV и до утра оставляют при -20°C .

Размороженный осадок тщательно гомогенизируют и разводят буфером IV до объема 170 мл. По каплям из делительной воронки при хорошем перемешивании добавляют 17 мл 10%-ного раствора тритона X-100. После 30 мин инкубации рН смеси доводят до 6,0 с помощью 1 М CH_3COOH . Смесь центрифугируют 30 мин. Супернатант аккуратно по стенкам сливают через воронку с 4 слоями марли. рН супернатанта доводят до 7,5 1 М NaOH и оставляют на холоде. Осадок гомогенизируют в 135 мл буфера IV, рН доводят до 7,5 и добавляют по каплям из делительной воронки 1 мл 10%-ного раствора тритона X-100. Через 30 мин инкубации рН доводят до 6,0 1 М CH_3COOH и смесь центрифугируют 30 мин. Супернатант фильтруют через 4 слоя марли, доводят рН до 7,5 1 М NaOH и объединяют с первым экстрактом. Измеряют общий объем объединенных экстрактов. К тритоновому экстракту в стакане на 1 л при очень хорошем охлаждении (стакан должен быть полностью погружен в сосуд с тающим льдом) и перемешивании (магнитная мешалка) из делительной воронки тонкой струей по стенке стакана добавляют равный объем ацетона, предварительно охлажденного при -20°C . Смесь сразу центрифугируют в стеклянных стаканах на 0,5 л на центрифуге К-70 в течение 5 мин при 1300 g. Полученный осадок суспендируют в 150 мл буфе-

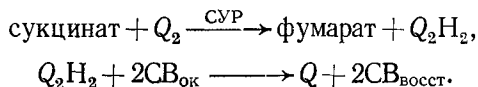
² Если это специально не оговорено в тексте, центрифугирование проводят при 22 000 g

ра III. К суспензии приливают из делительной воронки 8 мл 20%-ного раствора холата натрия и добавляют небольшими порциями в течение 10—15 мин 27,8 г сульфата аммония (0,176 г на мл) до насыщения 30%. Уменьшение величины рН раствора компенсируют добавлением нескольких капель концентрированного раствора аммиака. Смесь инкубируют 20 мин и центрифугируют 15 мин. Супернатант фильтруют через 4 слоя марли и медленно, порциями добавляют сульфат аммония до насыщения 50% (0,125 г на мл). Через 20 мин смесь центрифугируют 15 мин. Полученный осадок оставляют при 0—4° С на ночь в центрифужном стакане.

Осадок гомогенизируют стеклянной палочкой в 6 мл буфера V, добавляют 42 мл холодного бидистиллята и 23 мл кальцийфосфатного геля, инкубируют при перемешивании 10 мин, смесь центрифугируют 5 мин и супернатант отбрасывают. Плотный осадок геля тщательно гомогенизируют с помощью гомогенизатора Поттера в 50 мл раствора, содержащего 0,1% тритона X-100, 0,2 мМ ЭДТА и 20 мМ малонат калия, и центрифугируют 5 мин. Супернатант отбрасывают. Осадок гомогенизируют в 50 мл буфера VI, инкубируют 15 мин и центрифугируют 5 мин. При этом в супернатант специфически элюируется СУР. Элюцию повторяют, используя для вторичной экстракции 25 мл буфера VI. Супернатанты объединяют. При хорошем охлаждении и перемешивании добавляют равный объем охлажденного до —20° С ацетона. Смесь немедленно центрифугируют при 1300 g в течение 15 мин в стеклянных стаканах на 0,5 л на центрифуге К-70. Осадок суспендируют в 3 мл буфера VII для удаления остатков ацетона и центрифугируют 20 мин при 30 000 g. Полученный осадок СУР суспендируют в 3 мл буфера VII, отбирают на определение белка 40 мкл препарата, а остальное количество разливают в полиэтиленовые ампулы по 100 мкл и замораживают в жидком азоте.

Определение концентрации белка в препарате СУР. 40 мкл препарата СУР растворяют, добавляя 80 мкл буфера VII, содержащего однопроцентный раствор тритон X-100. Содержание белка измеряют по методу Лоури (с. 81) с модификацией, применяемой для определения белка в растворах тритона X-100. В этом случае в раствор карбоната натрия, использующийся для определения, добавляют додецилсульфат натрия до конечной концентрации 0,3%. Далее определение ведется обычным способом. Измеряют содержание белка в 20 мкл разведенного препарата СУР.

Измерение активности препарата СУР. Определение проводят в среде для измерения активности (16), содержащей 30 мкМ СВ и 5 мкМ Q_2 . В такой системе убихинон Q_2 восстанавливается при участии СУР, а затем в неферментативной реакции практически мгновенно передает электроны на СВ:



В ходе реакции Q_2 постоянно регенерируется и его концентрация остается постоянной. Окисленная форма СВ окрашена в фиолетовый цвет и имеет максимум поглощения при 612 нм (коэффициент молярной экстинкции — 12 000 М⁻¹ см⁻¹). Восстановленная форма СВ бесцветна. Таким образом, реакцию, катализируемую СУР, можно измерить спектрофотометрически при 612 нм по падению оптической плотности раствора СВ. Перед измерением активности препарат СУР замораживают и разводят в 50 раз буфером V. Фермент инкубируют при

комнатной температуре в течение 30 мин для активации сукцинатдегидрогеназы (с. 428), затем пробирку с ферментом помещают на лед.

В кювету спектрофотометра помещают 2 мл среды измерения активности. Включают прибор и выводят перо самописца в крайнее положение. Убедившись в том, что в отсутствие фермента не происходит изменения оптической плотности среды, добавляют 10 мкл. разведенного препарата СУР и регистрируют восстановление СВ, сопряженное с сукцинат:убихинон-редуктазной реакцией. Добавляют 0,02 мл 20 мМ ТТА, при этом активность СУР резко тормозится. Рассчитывают каталитическую активность фермента в микромолях окисленного сукцината в минуту на 1 мг белка и степень торможения реакции ТТА.

Студентам предлагается самостоятельно:

1. Изучить зависимость скорости реакции от концентрации Q_2 . С этой целью в среду измерения активности добавляют в различных концентрациях Q_2 (0; 0,2; 0,4; 0,8; 2 и 5 мкМ). Строят график зависимости скорости реакции от концентрации Q_2 в прямых и двойных обратных координатах. Находят значение $V_{\max}$ и K_m СУР для Q_2 .
2. Изучить зависимость скорости реакции, катализируемой СУР, от концентрации ТТА и определить тип торможения реакции ингибитором. При выполнении этой части задачи из среды измерения активности исключают тритон X-100.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tushurashvili P. R., Gavrikova E. V., Ledenev A. N. et al. Studies on the succinate dehydrogenase system. Isolation and properties of the mitochondrial succinate—ubiquinone reductase//*Biochim. Biophys. Acta*. 1985. Vol. 809. P. 145.
2. Grivennikova V. G., Vinogradov A. D. Kinetics of ubiquinone reduction by the resolved succinate: ubiquinone reductase//*Biochim. Biophys. Acta*. 1982. Vol. 682. P. 491.
3. Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Взаимодействие сукцинат убихинон-редуктазы митохондрий с теноилтрифторацетоном и карбоксином//*Биохимия*. 1985. Т. 50, № 3. С. 375.
4. Yu J., Steck T. L. Isolation and characterization of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane//*J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 9170.
5. Виноградов А. Д. Сукцинат: убихинон-редуктазный участок дыхательной цепи//*Биохимия*. 1986. Т. 51, № 12. С. 1944.

5. ПОЛУЧЕНИЕ СУКЦИНАТ: ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ (КОМПЛЕКС II+III)

Сукцинат:цитохром *c*-оксидоредуктаза (SCR) катализирует окисление сукцината добавленным цитохромом *c* с образованием фумарата и восстановленного цитохрома *c*. В состав фермента входят компоненты сукцинат:убихинон-редуктазы (см. с. 423) и компоненты убихинон:цитохром *c*-редуктазы (см. с. 429). Реакция практически полностью подавляется малонатом и оксалоацетатом (конкурентные ингибиторы дегидрирования сукцината), теноилтрифторацетоном и карбоксином — ингибиторами восстановления убихинона сукцинатом и антимицином А — ингибитором окисления убихинола цитохромом *c*. Получение препарата основано на «красно-зеленом» расщеплении дыхательной цепи детергентами при высокой ионной силе, в результате которого «красные» комплексы I, II и III оказываются солюбилизованными, а «зеленая» цитохромоксидаза (комплекс IV) остается нерастворимой. В результате дальнейшего фракционирования солюбилизи-

рованных комплексов удается получить ССК, состоящую по данным электрофореза из 9—10 полипептидов и обладающую высокой каталитической активностью.

Получение препарата SCR. Препарат Кейлина—Хартри (получение см. на с. 407) суспендируют в 0,1 М фосфатном буфере (натриевые соли), содержащем 0,2 мМ ЭДТА, рН 7,4. Содержание белка в суспензии доводят до 30 мг/мл. Стакан с суспензией помещают на лед и при хорошем перемешивании (магнитная мешалка) медленно добавляют холат натрия (рН 7,4) из 10—20%-ного раствора до конечной концентрации 1%. К суспензии, содержащей детергент, небольшими порциями шпателем добавляют мелко растертый сульфат аммония из расчета 144 г/л. После добавления каждой трети требуемого количества сульфата аммония рН суспензии проверяют и при необходимости доводят до 7,4 концентрированным раствором аммиака. Смесь оставляют при хорошем перемешивании на холоде на 1 ч и после этого добавляют сульфат аммония из расчета 61 г/л. рН суспензии проверяют и при необходимости доводят до 7,4. Спустя 20 мин смесь центрифугируют при 40 000 *g* в течение 1 ч. Прозрачный красно-оранжевый супернатант сливают в охлажденный мерный цилиндр через 4 слоя марли, избегая вспенивания и загрязнения супернатанта рыхлым слоем осадка.

Осадок сохраняют в виде замороженной при -20°C суспензии и используют для получения цитохромоксидазы (с. 432).

К известному объему супернатанта на холоде при хорошем перемешивании медленно добавляют сульфат аммония (каждую следующую порцию после полного растворения предыдущей) из расчета 94 г на 1 л супернатанта. Через 20 мин помутневшую смесь центрифугируют 30 мин при 40 000 *g*. Супернатант после центрифугирования отбрасывают, осадок растворяют, помешивая палочкой, или в свободном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 1/4 исходного объема суспензии препарата Кейлина—Хартри в смеси, содержащей 0,1 М фосфатный буфер, 0,5%-ный холат и 0,2 мМ ЭДТА (натриевые соли), рН 7,4. Прозрачный или слегка мутный раствор оставляют при слабом перемешивании в холодной комнате на ночь.

Помутневшую за ночь суспензию (выпадение в осадок примесей цитохромоксидазы) центрифугируют 1,5 ч при 78 000 *g*. Прозрачный красный супернатант тщательно отделяют от мелкодисперсного осадка и помещают в диализную трубку. Отрезок диализной трубки подходящей длины готовят кипячением в течение 1—2 ч в 1%-ном бикарбонате калия, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, и тщательным промыванием бидистиллятом. Завязанную с обоих концов диализную трубку, содержащую прозрачную сукцинат:цитохром *c*-редуктазу, помещают в большой стакан, снабженный магнитной мешалкой, и оставляют для диализа в холодной комнате против примерно 20 объемов раствора, содержащего 0,25 М сахарозу, 10 мМ фосфат натрия, 0,2 мМ ЭДТА, рН 7,4. Диализный буфер меняют дважды: через 3—4 ч после начала диализа и на ночь. На следующий день мутное содержимое диализной трубки центрифугируют 1 ч при 40 000 *g*, полученный осадок тщательно суспендируют в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в небольшом объеме раствора, содержащего 0,5 М сахарозу, 10 мМ трис- SO_4 , 0,2 мМ ЭДТА, рН 7,5, разливают в полиэтиленовые сосудики по порциям, требуемым для дальнейших опытов, и замораживают. Препарат хорошо сохраняется при длительном хранении при -20°C и неопределенно долго может храниться в жидком азоте. Для выбора объемов замораживаемых образцов следует тщательно спла-

низовать дальнейшие эксперименты, так как при повторных замораживаниях и оттаиваниях препарат теряет каталитическую активность.

Измерение активностей препарата. *Подготовка препарата.* Сукцинатдегидрогеназа способна связывать в активном центре оксалоацетат с чрезвычайно высоким сродством. Процесс диссоциации ингибитора очень медленный, особенно при низких температурах. В связи с этим при измерении любых активностей митохондриальных ферментов, в которых участвует дегидрирование сукцината, необходимо быть уверенным, что сукцинатдегидрогеназа находится в активном состоянии. С этой целью обычно поступают следующим образом: препарат фермента преинкубируют с сукцинатом (конечная концентрация 10—20 мМ, что много больше K_s) в условиях, при которых его валовое окисление невозможно (анаэробно, отсутствие добавленных акцепторов, присутствие цианида для блокирования цитохромоксидазы). Преинкубацию проводят при $\sim 30^\circ \text{C}$ в течение 30 мин. За это время происходит полное вытеснение оксалоацетата из активного центра фермента. Этот процесс называют «активацией» сукцинатдегидрогеназы.

Полученную сукцинат:цитохром *c*-оксидоредуктазу суспендируют в 25 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и 20 мМ сукцинат калия, pH 7,4—7,8, при 30°C в течение 30 мин. Препарат помещают на лед или оставляют на время опыта при комнатной температуре.

Регистрация активности. А. Кювету спектрофотометра заполняют раствором, содержащим 25 мМ фосфатный буфер, 0,1 мМ ЭДТА, 20 мМ сукцинат калия и 40 мкМ цитохром *c*, pH 7,4. Устанавливают длину волны регистрации 550 нм, как описано на с. 412. Реакцию начинают внесением активированного препарата ($\sim 2\text{--}10$ мкг/мл среды измерения) фермента и рассчитывают его активность в микромолях окисленного сукцината за 1 мин на 1 мг белка. Коэффициент молярной экстинкции для восстановленного цитохрома *c* ($A_{550}^{\text{red}} - A_{550}^{\text{ox}}$) = 18. Б. В связи с тем что цитохром *c* служит акцептором электронов, но не протонов, сукцинат:цитохром *c*-редуктазная активность при pH > 6 может быть записана в виде:

$\text{сукцинат}^{-2} + 2 \text{ цитохром } c_{\text{ox}} \rightarrow \text{фумарат}^{-2} + 2 \text{ цитохром } c_{\text{red}} + 2\text{H}^+$,
и активность фермента может быть прослежена по выделению H^+ -ионов в слабозабуференной среде с помощью регистрирующего рН-метра достаточной чувствительности. Процедура определения активности таким способом совпадает в предыдущей, однако концентрацию буфера следует уменьшить в 10 раз. Калибровка регистрирующего рН-метра и ход работы при определении активности описаны на с. 474.

Студентам предлагается самостоятельно выполнить следующие работы:

1. Сравнение каталитических активностей: сукцинат:цитохром *c*-редуктазной, сукцинат:феназинметосульфат-редуктазной, сукцинат:убихинон-редуктазной для полученного препарата.
2. Определение величин K_s для сукцината и K_i для малоната при использовании различных акцепторов электронов.
3. Влияние фосфолипидов и детергентов на активность сукцинат:цитохром *c*-редуктазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hatefi Y. Introduction — Preparation and properties of the enzymes and enzyme complexes of the mitochondrial oxidative phosphorylation system//Methods in Enzymology/S. Fleisher, L. Packer eds. N. Y. 1978. Vol. LIII. P. 3.

2. Yu C. A., King T. E. Soluble cytochrome *b*—*c*₁ complex and the reconstitution of succinate—cytochrome *c* reductase//J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 4905.
3. Trumpower B. L., Simmons Z. Diminished inhibition of mitochondrial electron transfer from succinate to cytochrome *c* by thenoyltrifluoroacetone induced by antimycin//J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254. P. 4608.
4. Hatefi Y., Stiggall D. L. Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II)//Methods in Enzymology/S. Fleisher, L. Packer eds. N. Y. 1978. Vol. LIII. P. 21.
5. Котляр А. Б., Виноградов А. Д. Константы диссоциации комплексов сукцинатдегидрогеназы с сукцинатом, фумаратом и малонатом//Биохимия. 1984. Т. 49, вып. 3. С. 511.
6. Tappel A. L. Inhibition of electron transport by antimycin A, alkyl hydroxy naphthoquinones and metal coordinating compounds//Biochem. Pharmacol. 1960. Vol. 3. P. 289.
7. Moewry P. S., Steenkamp D. J., Ackrell B. A. C. et al. Inhibition of mammalian succinate dehydrogenase by carboxins//Arch. Biochem. Biophys. 1977. Vol. 178. P. 494.
8. Rieske J. S. Composition, structure and function of complex III of the respiratory chain//Biochim. Biophys. Acta. 1976. Vol. 456. P. 195.

6. ПОЛУЧЕНИЕ УБИХИНОН:ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ (КОМПЛЕКС III)

Убихинон:цитохром *c*-оксидоредуктаза катализирует окисление добавленных гомологов убихинола цитохромом *c* с образованием окисленного гомолога и восстановленного цитохрома *c*. Комплекс представляет собой липопротеинидный ансамбль, содержащий цитохромы *b*, *c*₁, железо-серный белок, прочносвязанный убихинон и фосфолипиды. В литературе описаны два основных способа получения комплекса. Первый основан на фракционировании НАДН:цитохром *c*-оксидоредуктазы солями в присутствии детергентов. Второй — на специфическом расщеплении сукцинат:цитохром *c*-оксидоредуктазы при щелочных значениях pH на сукцинатдегидрогеназу и убихинон:цитохром *c*-оксидоредуктазу. Препараты, получаемые обоими методами, практически не различаются ни по полипептидному составу, ни по каталитической активности. Оба препарата могут быть включены в состав протеолипосом, так что катализируемая ими реакция оказывается сопряженной с векторным перемещением протонов через осмотически активный барьер (второй пункт электрохимического сопряжения).

Получение комплекса III. Все операции проводят на холоде (0...—4° С). Сукцинат:цитохром *c*-оксидоредуктазу, полученную как описано на с. 426, суспендируют в фосфатном буфере (калиевые соли) с pH 7,4 до конечной концентрации белка 5 мг/мл. Суспензию помещают в небольшую трехгорлую колбу, снабженную насадкой для деаэрирования, pH-электродом (комбинированный электрод, пропущенный через герметически закрытый шлиф) и делительной воронкой. Колбу охлаждают в сосуде со льдом, помещенном на магнитную мешалку.

Смесь насыщают аргоном в течение ~30 мин, добавляют 1 М сукцинат калия, так чтобы его конечная концентрация составляла 20 мМ, и продолжают анаэробную инкубацию при перемешивании в течение 30 мин. pH суспензии доводят деаэрированным раствором 2 М КОН до 10,5 и инкубируют при перемешивании 30 мин. Суспензию под током аргона переносят в герметически закрывающиеся пробирки ультрацентрифуги и центрифугируют 90 мин при 200 000 *g*. Коричневато-желтый супернатант, содержащий растворимую сукцинатдегидрогеназу, сливают (супернатант после нейтрализации можно использовать в качестве разведенного препарата сукцинат:феназинмето-

сульфат-редуктазы или сконцентрировать его осаждением сульфатом аммония 50%-ного насыщения). Осадок суспендируют в деаэрированном 50 мМ фосфатном буфере (рН 10,5) и осаждают центрифугированием в течение 40 мин при 130 000 g. Супернатант отбрасывают, а осадок тщательно суспендируют в небольшом объеме 0,9%-ном KCl. Измеряют содержание белка с биуретовым реактивом и суспензию разводят до конечной концентрации белка 10 мг/мл.

К суспензии добавляют 10%-ный дезоксихолат калия (рН 9,0) до конечного содержания 0,3 мг на 1 мг белка. Смесь перемешивают на мешалке 10—15 мин и центрифугируют 30 мин при 40 000 g. Осадок (если имеется) отбрасывают, а к ярко-красному прозрачному супернатанту медленно добавляют равный объем нейтрализованного насыщенного при комнатной температуре сульфата аммония. Помутневший раствор перемешивают 20 мин и центрифугируют 20 мин при 15 000 g. Плотный, ярко-красный, вязкий осадок³ растворяется медленно, в небольшом объеме раствора, содержащего 0,25 М сахарозу и 20 мМ фосфатный буфер, рН 7,4. Нерастворившийся материал отделяют центрифугированием в течение 20 мин при 20 000 g. Прозрачный ярко-красный раствор содержит убихинон:цитохром *c*-редуктазу.

Раствор фермента помещают в подготовленную заранее диализную трубку и диализуют на холоде против 10—20-кратного забуференного раствора 0,25 М сахарозы в течение 24 ч, грижды меняя буфер. Полученную суспензию разливают в подходящие полиэтиленовые сосудики и хранят в замороженном состоянии при —20° С или в жидком азоте.

Измерение активности убихинон:цитохром *c*-оксидоредуктазы. В качестве естественных субстратов для комплекса III служат восстановленный убихинон (убихинол) и окисленный цитохром *c*. Природные убихинон и убихинол, содержащие 10 изопреноидных остатков в боковой цепи, совершенно нерастворимы в воде. В связи с этим для измерения активностей ферментов, для которых убихинон служит либо донором электронов, либо акцептором, приходится принять искусственные гомологи, или аналоги убихинона. Антимицинчувствительная убихинол:цитохром *c*-редуктазная активность может быть измерена в водных средах с использованием гомолога убихинона — Q_2 (два изопреноидных остатка в боковой цепи) или его аналога — дурухинола (восстановленный 2,3,5,6-тетраметилбензохинон).

Приготовление убихинола (Q_2H_2). В пробирке со шлифом объемом около 10 мл помещают 10 мг Q_2 и растворяют в 3 мл этилового спирта. Добавляют равный объем воды и деаэрируют (продувают 5—10 мин аргоном с помощью пастеровской пипетки, соединенной с кислородной подушкой, заполненной аргоном). В пробирку вносят несколько кристаллов гидросульфита (дитионита) натрия и 5—10 мг кристаллического KCl. Содержимое пробирки помешивают в токе аргона до полного обесцвечивания раствора (3—5 мин). К раствору добавляют 2 мл деаэрированного циклогексана, пробирку закрывают, встряхивают 2—3 мин и оставляют до полного расслоения фаз. Верхнюю фазу, содержащую хинол в циклогексане, отбирают пастеровской пипеткой и переносят в небольшой сосуд для дальнейшего упаривания в роторном испарителе. Экстракцию циклогексаном повторяют, экстракты объединяют и упаривают досуха в роторном испарителе (конси-

³ Иногда при центрифугировании липопrotein всплывает и происходит его сорбция на стенке центрифужной пробирки. В этих случаях всплывший материал следует тщательно собрать, осторожно отсосав раствор из пробирки с помощью пастеровской пипетки. Дальнейшие процедуры проводят, как указано.

стенция масла). Масло растворяют в 1,5 мл абсолютного этанола, к которому добавляют 2 мкл 1 н. HCl. Раствор хорошо сохраняется в течение нескольких дней при хранении на холоде (-20°C) в плотно закрытом сосуде, заполненном аргоном. При аутоокислении раствор желтеет.

Приготовление duroхинола. В пробирку со шлифом объемом на ~ 10 мл готовят 30 мМ раствор duroхинола в деаэрированном (см. выше) метаноле. К раствору добавляют несколько кристаллов сухого боргидрида натрия и смесь перемешивают до полного исчезновения желтой окраски. Избыток боргидрида разлагают добавлением 20 мкл 3 н. HCl, пробирку заполняют аргоном, плотно закрывают и хранят на холоде в течение опыта (5—6 ч). При аутоокислении раствор желтеет.

Измерение Q_2H_2 (duroхинол):цитохром *c*-редуктазной активности. Устанавливают длину волны регистрирующего прибора на отметке 550 нм, как указано на с. 412. Кювету спектрофотометра, заполненную раствором, содержащим 20 мМ фосфатный буфер, 50 мкМ ЭДТА, 20 мкМ цитохром *c* и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, помещают в прибор. В кювету добавляют duroхинол (конечная концентрация 60 мкМ) или Q_2H_2 (конечная концентрация 50 мкМ) и регистрируют в течение 1 мин неэнзиматическое восстановление цитохрома *c* хинолом. В кювету вносят препарат фермента (~ 2 мкг/мл, если донором служит Q_2H_2 и ~ 20 мкг/мл, если донором служит duroхинол) и регистрируют прирост скорости восстановления цитохрома *c*. Ферментативную активность рассчитывают по разнице скоростей реакции в присутствии и в отсутствие фермента и выражают в микроэлектрон-эквивалентах за 1 мин в расчете на 1 мг белка. Ферментативная активность полностью подавляется антимицином А.

Студенту предлагается самостоятельно выполнить следующие задачи:

- 1) получить кривую титрования активности фермента антимицином А;
- 2) изучить влияние преинкубации фермента с фосфолипидами на его активность;
- 3) осуществить реконструкцию сукцинат:цитохром *c*-оксидоредуктазы из сукцинатдегидрогеназы (с. 415) и убихинол:цитохром *c*-оксидоредуктазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rieske J. S., Hansen R. E., Zaugg W. S. Studies on the electron transfer system. LVIII. Properties of a new oxidation-reduction component of the respiratory chain as studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy//J. Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 3017.
2. Nelson D. B., Gellerfors P. Characterization and resolution of complex III from beef heart mitochondria//Methods in Enzymology/S. Fleisher, L. Packer eds. N. Y. 1978. P. 80.
3. Yu C. A., King T. E. Soluble cytochrome *b*—*c*₁ complex and the reconstitution of succinate-cytochrome *c* reductase//J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 4905.
4. Wikstrom M. Properties of three cytochrome *b*-like species in mitochondria and submitochondrial particles//Biochem. Biophys. Acta. 1971. Vol. 253. P. 332.
5. King T. E. Cytochrome *c*₁ from mammalian heart//Methods in Enzymology/S. Fleisher, L. Packer eds. N. Y. 1978. P. 181.
6. Trumpower B. L., Edwards C. A., Ohnishi T. Reconstitution of the iron—sulfur protein responsible for $g=1,90$ electron paramagnetic resonance signal and associated cytochrome *c* reductase activities to depleted succinate-cytochrome *c* reductase complex//J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 7487.
7. Guerrieri F., Nelson B. D. Studies on the characteristics of a proton pump in

phospholipid vesicles inlayed with purified complex III from beef heart mitochondria//FEBS Lett. 1975. Vol. 54. P. 339.

8. Mitchell P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *b*-*c*₁ complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle//FEBS Lett. 1975. Vol. 56. P. 1.

7. ПОЛУЧЕНИЕ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ (КОМПЛЕКС IV)

Перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий завершает цитохромоксидаза (цитохром *c*:O₂-оксидоредуктаза, комплекс IV), катализирующая реакцию восстановления молекулярного кислорода до воды. Донором электронов для фермента служит ферроцитохром *c*. Реакция специфически блокируется цианид- и азид-ионами, а также окисью углерода. Цитохромоксидаза прочно связана с внутренней мембраной митохондрий и является интегральным мембранным белком: в раствор фермент может быть высвобожден лишь после растворения мембраны высокими концентрациями детергентов. В нативной мембране, а также в растворах неионных детергентов (третон X-100, твин-80, Emasol-1130) цитохромоксидаза присутствует в виде высокоактивного димера. Некоторые воздействия (pH > 8,5, высокие концентрации солей и неионных детергентов) вызывают появление мономерных форм фермента. Каталитическая активность цитохромоксидазы зависит от степени агрегации молекулы фермента.

Цитохромоксидаза представляет собой сложный белковый комплекс, в состав которого входит по меньшей мере 8 индивидуальных полипептидов. Во внутримолекулярном переносе электронов участвуют простетические группы фермента: гемы *a* и *a*₃, а также 2 атома меди: Cu_A и Cu_B. Трансмембранный перенос электронов от цитохрома *c* к молекулярному кислороду сопровождается векторным переносом протона из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. Разность электрохимических потенциалов ионов водорода, генерируемая в цитохромоксидазной реакции на мембране митохондрий, может быть использована для синтеза АТФ.

В настоящей работе предлагается выделить очищенный препарат цитохромоксидазы, оценить степень его чистоты и изучить его кинетические свойства.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения препарата Кейлина—Хартри (с. 407).
2. 0,1 М фосфатно-боратный буфер, pH 7,6.
3. Холат натрия — 10%-ный раствор, pH 7,8.
4. Фосфат натрия — 0,1 М раствор, pH 7,4.
5. Фосфат натрия — 0,1 М раствор, (pH 7,4), содержащий 1,5%-ный холат натрия.
6. Фосфат натрия — 0,1 М раствор, (pH 7,4), содержащий 1%-ный твин-80.
7. Фосфат натрия — 0,1 М раствор, (pH 7,4), содержащий 0,25%-ный твин-80.
8. Сульфат аммония — кристаллический.
9. Сульфат аммония — насыщенный при комнатной температуре раствор.
10. Дитионит натрия.
11. Фосфат натрия — 0,05 М раствор (pH 7,4), содержащий 1%-ный твин-80.

12. Аскорбиновая кислота — 1 М раствор (рН 7,4)
13. Цитохром с — 2 мМ раствор.
14. NaOH — 1 М раствор.
15. Полярограф с набором кювет и микропипеток.

Выделение цитохромоксидазы. Выделяют препарат Кейлина—Хартри из двух сердец быка (с. 407).

К 80 мл препарата Кейлина—Хартри, суспендированного в 0,1 М фосфатно-боратном буфере (рН 7,6), с концентрацией белка 20 мг/мл при осторожном перемешивании добавляют 8,8 мл 10%-ного раствора холата натрия (конечная концентрация холата — 1%). Затем медленно, порциями добавляют твердый сульфат аммония до насыщения 25% (0,136 г/мл). Уменьшение рН раствора компенсируют добавлением 1 М NaOH (до рН 8,0). Смесь оставляют на 1 ч при постоянном перемешивании, затем добавляют твердый сульфат аммония до насыщения 35% (0,056 г/мл). Компенсируют уменьшение рН добавлением 1 М NaOH. Через 10 мин суспензию центрифугируют в течение 60 мин при 20 000 g. Прозрачный оранжево-красный супернатант отбрасывают (или используют для выделения сукцинат:цитохром с-редуктазы — см. с. 426), а коричнево-зеленый осадок суспендируют в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) в конечном объеме 60 мл. К суспензии добавляют 15 мл 10%-ного раствора холата натрия (конечная концентрация — 2%). Добавляют твердый сульфат аммония до насыщения 25% (0,136 г/мл), рН суспензии доводят до 7,7 с помощью 1 М NaOH и оставляют на ночь.

Смесь центрифугируют 30 мин (во всех случаях здесь и далее центрифугирование проводят при 22 000 g), осадок отбрасывают. К прозрачному, зеленовато-коричневому супернатанту добавляют твердый сульфат аммония до насыщения 40% (0,086 г/мл). Через 10 мин смесь центрифугируют в течение 15 мин. Светло-оранжевый супернатант отбрасывают, зеленовато-коричневый осадок растворяют в 20 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4), содержащем 1,5% холата натрия. К прозрачному раствору добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до тех пор, пока не появляется легкая, но заметная муть. Обычно это количество составляет около 7,5 мл (насыщение сульфата аммония — 24—26%). Смесь оставляют на 30 мин, затем центрифугируют 20 мин. Небольшой осадок отбрасывают. К прозрачному супернатанту добавляют насыщенный сульфат аммония до насыщения 37%. Для расчета необходимого количества сульфата аммония пользуются формулой, приведенной на с. 200.

После добавления сульфата аммония иногда выпадает темный вязкий осадок, который сильно прилипает к стенкам стеклянного стакана. Рекомендуются осаждение сульфатом аммония проводить прямо в центрифужном стакане: раствор сульфата аммония добавляют по каплям из делительной воронки, а содержимое стакана при этом постоянно встряхивают. Смесь центрифугируют 20 мин после 10 мин инкубации. Осадок растворяют в 16 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 1,5%-ный холат натрия. Снова добавляют насыщенный сульфат аммония до появления легкой мути. Через 30 мин смесь центрифугируют 20 мин, осадок отбрасывают, а супернатант насыщают сульфатом аммония до 36%. Через 10 мин смесь центрифугируют 20 мин. Осадок растворяют в 12 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 1%-ный твин-80. К раствору добавляют насыщенный сульфат аммония до появления легкой мути, осадок отделяют центрифугированием 20 мин, а к супернатанту добавляют насыщенный сульфат

рат аммония до насыщения 35%. Через 10 мин центрифугируют 20 мин. Осадок растворяют в 12 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 1%-ный твин-80 и повторяют процедуру ступенчатого фракционирования 2 раза, при этом «верхнее» насыщение снижают каждый раз на 1%. Осадок после последнего фракционирования растворяют в 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,25%-ный твин-80. Для удаления остатков сульфата аммония и холата натрия, который ингибирует цитохромоксидазу, препарат диализуют в диализной трубке против 1 л 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,25%-ный твин-80. Через 4 ч после начала диализа буфер меняют и диализ оставляют на ночь. Полученный препарат цитохромоксидазы хранят в жидком азоте.

Определение белка в препарате цитохромоксидазы. Содержание белка в полученном препарате измеряют с биуретовым реактивом (с. 483) в модификации Ионетани [3], которая состоит в том, что к раствору цитохромоксидазы перед добавлением биуретового реактива добавляют 0,05 мл 30%-ного раствора перекиси водорода. Такая обработка фермента позволяет уменьшить вклад поглощения фермента в оптическую плотность комплекса белка с биуретовым реактивом.

Определение содержания гема а в препарате цитохромоксидазы. В кювету спектрофотометра помещают 2 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 1,5%-ный холат натрия, и 0,1 мл полученного препарата. Измеряют оптическую плотность раствора при 605 нм. Затем фермент восстанавливают, добавляя несколько кристаллов дитионита. Через 10 мин регистрируют значение оптической плотности раствора при 605 нм. Концентрацию гема а рассчитывают, исходя из разности коэффициентов молярной экстинкции окисленной и восстановленной форм гема, которая при 605 нм составляет $12 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Высокоочищенные препараты цитохромоксидазы, выделенные предложенным методом, содержат около 11 нмоль гема а на 1 мг белка фермента.

Измерение активности цитохромоксидазы. Активность фермента измеряют полярографическим методом (с. 480) по поглощению кислорода из среды измерения. В кювету полярографа помещают 2 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 1%-ный твин-80. Добавляют 0,04 мл 1 М аскорбиновой кислоты и 0,08 мл 2 мМ цитохрома с. Кювету устанавливают в штатив полярографа, ожидают, пока значение тока выйдет на постоянный уровень, и реакцию начинают добавлением препарата цитохромоксидазы (10—100 мкг). Из полярограммы находят величину каталитической активности фермента и рассчитывают число его оборотов.

Студентам предлагается самостоятельно:

1. Оценить степень чистоты выделенного препарата.
2. Изучить зависимость скорости реакции от концентрации цитохрома с.
3. Изучить зависимость числа оборотов фермента от концентрации цитохромоксидазы в среде измерения активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuboyama M., Young F. C., King T. E. Studies on cytochrome oxidase. VIII. Preparation and some properties of cardiac cytochrome oxidase//J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 6375.
2. Hartzell C. R., Beinert H., Gelder B. F. van, King T. E. Preparation of cytochrome oxidase from beef heart//Methods in Enzymology. N. Y., 1978. Vol. LIII. P. 54.

3. Yonetani T. Studies on cytochrome oxidase. III. Improved preparation and some properties//J. Biol. Chem. 1961. Vol. 236. P. 1680.
4. Capaldi R. A., Malatesta F., Darley-Ussmar V. M. Structure of cytochrome c oxidase//Biochim. Biophys. Acta. 1983. Vol. 726. P. 135.
5. Nicholls P., Hildebrandt V., Hill B. C. et al. Pathways of cytochrome c oxidation by soluble and membrane-bound cytochrome aa_3 //Can. J. Biochem. 1980. Vol. 58. P. 969.

IV. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

1. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ. ИНГИБИТОРЫ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Перенос электронов от субстратов цикла трикарбоновых кислот к кислороду, сопровождающийся образованием воды, осуществляется сложной полиферментной системой, локализованной во внутренней мембране митохондрий. Последовательность функционирования отдельных дыхательных переносчиков в значительной мере была выяснена благодаря применению ингибиторного анализа, а также спектрофотометрических исследований. В настоящее время строение дыхательной цепи может быть представлено схемой на рис. 51.

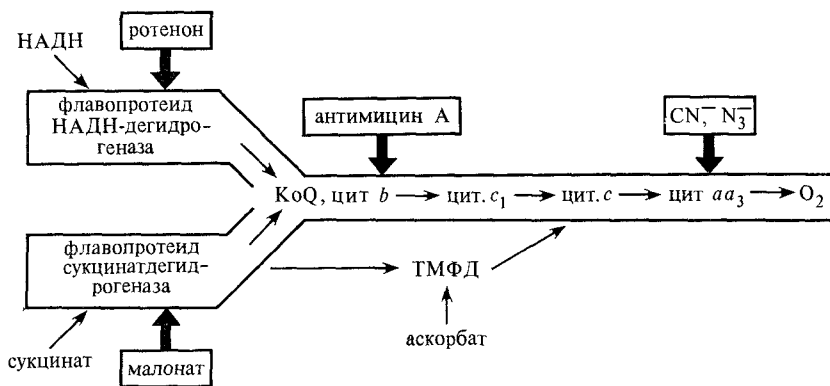


Рис. 51. Схема переноса электронов в дыхательной цепи (места действия ингибиторов указаны жирными стрелками)

Окислительно-восстановительные потенциалы каждого переносчика увеличиваются по мере приближения к кислороду, так что электроны, отщепленные от субстратов соответствующими дегидрогеназами, переносятся за кислороду термодинамически самопроизвольно. Внутренняя мембрана митохондрий содержит полную дыхательную цепь с двумя дегидрогеназами (суццината и НАДН). Известно несколько специфических ингибиторов переноса электронов.

В настоящей работе предлагается изучить действие ингибиторов на суммарную реакцию, катализируемую дыхательной цепью — поглощение кислорода. Опыты проводят с препаратами Кейлина—Хартри, для измерения потребления кислорода пользуются полярографическим методом (с. 480).

Реактивы:

1. Реактивы для получения препарата Кейлина—Хартри (с. 407).
2. Фосфат калия — 0,1 М раствор, pH 7,6.

3. Цитохром *c* — 1 мг/мл.
4. НАДН — 0,1 М раствор, рН 7,6.
5. Сукцинат калия — 0,5 М раствор, рН 7,6.
6. Аскорбиновая кислота — 0,5 М раствор, рН 7,6.
7. Тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД) — 0,01 М раствор.
8. Малонат калия — 0,5 М раствор, рН 7,6.
9. Антимицин А — 0,1 мг/мл (готовят в перегнанном этаноле).
10. Ротенон — 1 мг/мл (готовят в перегнанном этаноле).

Определение типа ингибирования окисления сукцината малонатом.

Выделяют препарат Кейлина—Хартри (с. 407).

Пять кювет полярографа заполняют раствором, содержащим 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,6) и цитохром *c* (100 мкг/мл). Объем раствора в каждой кювете — 2 мл. В пробы с помощью микропипеток добавляют сукцинат в конечных концентрациях 0,3; 0,6; 1,25; 5,0 мМ. Измеряют скорость дыхания в присутствии различных концентраций субстрата. Для этого кювету устанавливают в штативе полярографа, погружают в нее электроды. После установления начального значения тока добавляют 0,05 мл суспензии препарата Кейлина—Хартри (1,5 мг/мл) и регистрируют поглощение кислорода. Во всех пробах рассчитывают скорость дыхания в микромолях поглощенного кислорода за 1 мин на 1 мг белка.

Измерения повторяют в тех же условиях, но во все пробы добавляют вначале 200 мкМ, а затем — 300 мкМ малонат.

Строят график зависимости скорости дыхания от концентрации сукцината и определяют тип ингибирования

Места действия ингибиторов. Кювету полярографа заполняют фосфатным буфером, содержащим 100 мкг цитохрома *c* в 1 мл. Объем пробы — 2 мл. Добавляют 0,05 мл суспензии препарата Кейлина—Хартри и, установив кювету в штатив полярографа, ждут постоянного значения тока. Реакцию начинают добавлением НАДН (1 мМ) и спустя 1 мин после начала дыхания добавляют 0,02 мл раствора ротенона. После установления постоянной скорости дыхания в кювету добавляют сукцинат (5 мМ) и спустя еще 1 мин — 0,02 мл раствора антимицина А. Торможение дыхания снимают добавлением в кювету 100 мкМ ТМФД. В присутствии последнего дыхание обеспечивается активностью сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазного участка дыхательной цепи. В таких условиях дыхание может быть заторможено блокированием сукцинатдегидрогеназы (плюс 5 мМ малонат) и активировано неферментативным восстановлением ТМФД аскорбатом (5—10 мМ аскорбат). Полученная полярограмма позволяет сделать вывод о местах действия ингибиторов и путях переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий

ЛИТЕРАТУРА

1. Котельникова А. В. Промежуточные реакции при процессах окислительного фосфорилирования//Усп. биол. химии. М., 1962. Вып. 4. С. 173.
2. Котельникова А. В. Новые данные о механизме окислительного фосфорилирования//Усп. биол. химии. М., 1964. Вып. 6. С. 156.
3. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.
4. Chance B, Williams G R The respiratory chain and oxidative phosphorylation//Adv. in Enzymol. 1956. Vol. 17. P. 65.

2. ОКИСЛЕНИЕ НАДН В МИТОХОНДРИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ

Пиридиннуклеотиды принадлежат к числу широко распространенных низкомолекулярных компонентов клетки. Так, суммарное содер-

жение НАД(Ф)⁺ и НАД(Ф)Н в печени, например, превышает 1 мкмоль/г сырого веса ткани. Пиридиннуклеотиды выполняют важную метаболическую функцию, являясь кофакторами большого числа дегидрогеназ.

Соотношение окисленных и восстановленных форм пиридиннуклеотидов — важный функциональный показатель, характеризующий скорость и направление обменных процессов в клетках и тканях. Очевидно, что величина этого соотношения определяется, с одной стороны, активностью НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, а с другой стороны — активностью систем, катализирующих окисление восстановленных пиридиннуклеотидов.

Сопряженное с синтезом АТФ окисление НАДН в дыхательной цепи митохондрий представляет собой один из путей утилизации восстановительных эквивалентов клетки. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для пиридиннуклеотидов и добавленный НАДН может быть окислен в дыхательной цепи только после разрушения внутренней мембраны. Однако в клетке существуют специальные «челночные механизмы», которые обеспечивают окисление цитоплазматического НАДН дыхательной цепью и не требуют его переноса через внутреннюю мембрану митохондрий.

В митохондриях некоторых тканей (печени, почки и др.) была обнаружена еще одна НАДН-оксидазная система, которая локализована в наружной мембране и, по-видимому, легко доступна для цитоплазматического НАДН. Этот так называемый «внешний, нефосфорилирующий путь окисления НАДН» включает в себя специфический флавопротеид — НАДН:цитохром *b*₅-оксидоредуктазу и цитохром *b*₅. Цитохром *b*₅ является слегка аутоксидабельным гемопротеидом, а физиологическим акцептором электронов с цитохрома *b*₅, по-видимому, служит цитохром *c*. В экспериментальных условиях активность этого пути окисления НАДН может быть измерена только после добавления цитохрома *c*, значительная часть которого вымывается из межмембранного пространства в процессе выделения митохондрий. В отличие от НАДН-оксидазной активности дыхательной цепи митохондрий внешний путь окисления НАДН нечувствителен к ротенону.

В настоящей задаче студенту предлагается ознакомиться с путями окисления НАДН в митохондриях сердца и печени крысы.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени и сердца крысы (с. 405, 406).
2. Среда инкубации: 0,15 М сахароза, 75 мМ КСl, 2,5 мМ MgCl₂ и 5 мМ КН₂РO₄, рН 7,4.
3. Цитохром *c* — 10 мг/мл.
4. Ротенон — 5·10⁻⁴ М раствор (в этиловом спирте).

Митохондрии сердца и печени крысы получают в соответствии с описанием на с. 405, 406 и хранят на льду. Отбирают часть полученной суспензии (около половины) в отдельную полиэтиленовую пробирку, быстро замораживают препарат жидким азотом или сухим льдом и вновь размораживают, нагревая до 0° С. Процедуру замораживания-оттаивания, при которой происходит разрушение митохондрий, повторяют еще дважды. Размороженный препарат митохондрий суспендируют пипеткой и хранят на льду.

Сравнивают НАДН-оксидазную активность интактных и разрушенных митохондрий. Для этого в кювету полярографа наливают 2 мл среды инкубации, погружают в нее электроды и устанавливают исходное значение диффузионного тока (крайнее правое положение пера на диаграмме самописца КПС-4). Добавляют в кювету около 0,05 мл суспензии интактных или разрушенных митохондрий и спустя 1 мин добавляют НАДН в конечной концентрации 10^{-3} М. В течение 1—2 мин регистрируют оксидазную активность, после чего в кювету добавляют ротенон в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М. Спустя еще 1 мин в кювету добавляют цитохром *c* в конечной концентрации 100 мкг/мл и регистрируют оксидазную активность до полного истощения кислорода в среде.

Рассчитывают активности внутреннего (чувствительного к ротенону) и внешнего путей окисления НАДН в митохондриях. Полученные данные анализируют.

В качестве дополнения к задаче предлагается использовать другие методы разрушения внутренней мембраны: обработку митохондрий слабым раствором детергента (0,005—0,01%-ный тритон X-100) или ультразвуком, создание «осмотического шока».

ЛИТЕРАТУРА

1. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы. М., 1967.
2. Ленинджер А. Биохимия. М., 1974.
3. Евтодненко Ю. В., Скулачев В. П., Чистяков В. В. Участие цитохрома b_5 в окислительных системах печени//Митохондрии. Структура и функции. М., 1966. С. 113.
4. Sottocasa G. L., Sandri G. The permeability to pyridine nucleotides of mitochondria and outer mitochondrial membrane from rat liver//Biochemistry of intracellular structures. PWN. Warszawa, 1969. P. 7.

3. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕРВОГО ПУНКТА СОПРЯЖЕНИЯ В ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЯХ

Дыхательная цепь митохондрий представлена четырьмя дыхательными комплексами, катализирующими парциальные реакции окисления сукцината и НАДН кислородом (см. рис. 48, с. 415). В настоящее время установлено, что функционирование комплексов I, III и IV сопряжено с генерацией $\Delta\mu_{H^+}$. Изучение механизма функционирования комплексов в составе нативных митохондрий спектрофотометрическим методом затруднено из-за сильного светорассеяния митохондриальной суспензии. Неточности, возникающие в ходе спектральных измерений, могут быть источником ошибок в определении параметров ферментативных реакций. Это в полной мере относится к НАДН:убихинон-оксидоредуктазе. Для измерения реакции, катализируемой комплексом I в составе нативных митохондрий, в настоящей задаче предлагается использовать подход, позволяющий регистрировать ферментативную активность на полярографе. Принцип метода показан на рис. 52.

Митохондрии, обработанные антимицином А (ингибитором транспорта электронов от убихинона на кислород), катализируют реакцию окисления субстратов дыхания добавленными низкомолекулярными гомологами убихинона (*Q*). Образующийся в ходе реакции хинол (QH_2) окисляется затем кислородом в реакции, катализируемой субмитохондриальными фрагментами. В присутствии избыточного количе-

ства субмитохондриальных частиц скорость поглощения кислорода в такой системе определяется активностью НАДН:убихинон-оксидоредуктазного участка митохондрий. Описанный подход позволяет измерять убихинон-редуктазную реакцию в мутных средах в присутствии низких концентраций убихинона.

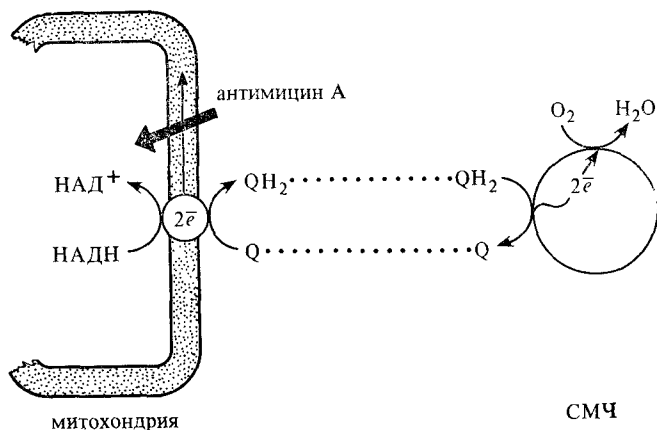


Рис. 52. Участие экзогенного убихинона в переносе восстановительных эквивалентов из обработанных антимицином А митохондрий в дыхательную цепь СМЧ

В настоящей задаче предлагается с использованием описанного подхода изучить функционирование НАДН:убихинон-оксидоредуктазы в интактных митохондриях печени крысы и продемонстрировать генерацию трансмембранного потенциала при восстановлении убихинона комплексом I.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения препарата Кейлина—Хартри (с. 407).
2. Реактивы для выделения митохондрий из печени крысы (с. 406).
3. Сахароза — 0,25 М раствор, содержащий 1 мг/мл БСА, освобожденного от жирных кислот, pH 8,0.
4. Среда инкубации, содержащая: 0,15 М сахарозу, 75 мМ KCl, 5 мМ фосфат калия, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ ЭДТА, 0,5 мг/мл БСА, освобожденного от жирных кислот.
5. Глутамат калия — 0,5 М раствор, pH 8,0.
6. Малат калия — 0,5 М раствор, pH 8,0.
7. Антимицин А — раствор в перегнанном этаноле, 1 мг/мл.
8. Q_1 , Q_2 , Q_6 — 0,5 М растворы в перегнанном этаноле.
9. 2,4-динитрофенол — 10 мМ раствор, pH 8,0.
10. Ротенон — 1 мМ раствор в перегнанном этаноле.
11. Полярограф с набором кювет, набор микропипеток объемом 0,02—0,05 мл и микрошприц объемом 0,01 мл.

Выделяют субмитохондриальные фрагменты из сердца быка (препарат Кейлина—Хартри, см. с. 407). Полученные в ходе выделения

осадки суомитохондрияльных частиц, суспендируют в небольшом объеме 0,25 М сахарозы, содержащей 1 мг/мл БСА, свободного от жирных кислот, разливают по небольшим пластиковым ампулам и хранят либо в жидком азоте, либо при температуре -20°C .

Выделяют митохондрии из печени крысы (с. 406). Последнюю промывку и суспендирование митохондрий проводят в 0,25 М сахарозе, содержащей 1 мг/мл БСА, освобожденного от жирных кислот.

В кювету полярографа помещают 2 мл среды инкубации (п. 4), погружают электроды и устанавливают положение пера самописца в исходное положение. Добавляют примерно 50 мкл густой (~ 100 мг/мл) суспензии митохондрий. Через 1—2 мин в кювету добавляют глутамат и малат до конечной концентрации, равной 5 мМ. Регистрируют постоянную скорость дыхания и через 1—2 мин добавляют 100 мкМ 2,4-динитрофенол. Наблюдают увеличение скорости поглощения кислорода.

Митохондриальную суспензию (1 мл) переносят в небольшую стеклянную пробирку, добавляют микрошприцем 4 мкл раствора антимицина А и инкубируют 20—30 мин при 0°C . Определяют малаattoксидазную активность митохондрий, как описано ранее. Наблюдают практически полное ингибирование активности, измеренной в присутствии динитрофенола. В том случае, если активность сохраняется, добавляют 1 мкл раствора антимицина А и повторяют измерение. Подбирают минимальное количество ингибитора, необходимое для практически полного ($\geq 90\%$) блокирования малаattoксидазной активности.

В полярографическую кювету, содержащую 2 мл среды инкубации, погружают электроды, вносят 50 мкл суспензии обработанных антимицином митохондрий, добавляют 5 мМ малат и 5 мМ глутамат и через 1—2 мин вносят 50 мкл густой (50—70 мг/мл) суспензии препарата Кейлина—Хартри. Внесение субмитохондриальных фрагментов практически не вызывает стимуляции поглощения кислорода. Реакцию инициируют добавлением 4 мкМ Q_2 (осуществляющего перенос электронов между митохондриями и субмитохондриальными фрагментами, неспособными окислять малат). По ходу реакции добавляют 100 мкМ динитрофенол и регистрируют увеличение скорости поглощения кислорода. В том случае, если стимуляция разобщителем не наблюдается, рекомендуется вдвое понизить количество вносимого препарата Кейлина—Хартри и (или) уменьшить концентрацию вносимого Q_2 . Повторяют измерение с другими гомологами убихинона: Q_1 (3 мкМ) и Q_6 (3 мкМ). Убеждаются в полной чувствительности наблюдаемой убихинон-редуктазной активности (измеренной с различными гомологами убихинона) к ротенону. С этой целью в кювету по ходу реакции вносят 5 мкМ ротенон и наблюдают полное ингибирование реакции.

Примечание. Следует тщательно отмывать электрод полярографа и кюветы 50%-ным спиртом, а затем много раз водой от ротенона, сильно сорбирующегося на оргстекле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ragan C. I., Hinkle P. C. Ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme Q reductase and phospholipids//J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 8472.
2. Ragan C. I., Cottingham I. R. The kinetics of quinone pools in electron transport//Biochim. Biophys. Acta. 1985. Vol. 811. P. 13.
3. Wikström M. Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone//FEBS Lett. 1984. Vol. 169. P. 300.
4. Николс Д. Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. М., 1985.

4. ИНГИБИРОВАНИЕ НАДН-ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ РОТЕНОНОМ

НАДН:убихинон-оксидоредуктазный комплекс дыхательной цепи митохондрий (комплекс I — см. с. 415) катализирует реакцию окисления НАДН эндогенным убихиноном. Активность НАДН:убихинон-оксидоредуктазы специфически ингибируется такими веществами, как амитал, пиридицин, реин и ротенон. Последний ингибитор наиболее широко применяется при изучении переноса электронов в дыхательной цепи и молекулярной организации комплекса I. Ротенон обладает сильно выраженными гидрофобными свойствами и способен помимо НАДН:убихинон-оксидоредуктазы взаимодействовать с гидрофобными участками многих белков, в частности бычьего сывороточного альбумина, и фосфолипидными мембранами.

В настоящей работе предлагается изучить кинетику торможения НАДН-оксидоредуктазной активности препарата Кейлина—Хартри ротеноном и определить кинетические и термодинамические параметры связывания ингибитора с ферментом. Реакция окисления НАДН кислородом сопровождается поглощением стехиометрического протона и может быть измерена с помощью регистрирующего рН-метра.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для получения препарата Кейлина—Хартри (с. 407).
2. Среда измерения активности, содержащая 0,15 М сахарозу, 75 мМ KCl, 5 мМ фосфат калия (рН 7,4) и цитохром с 20 мкг/мл.
3. Среда измерения активности (см. 2), содержащая альбумин из бычьей сыворотки 20 мг/мл.
4. НАДН — 0,1 М раствор, рН 7,4.
5. Ротенон — 1 мМ раствор в перегнанном этаноле.
6. Регистрирующий рН-метр с набором кювет и микропипеток объемом 0,02—0,1 мл.

Определение константы скорости инактивации фермента ротеноном. Выделяют препарат Кейлина—Хартри. Кювету рН-метра (объемом 4,5 мл) заполняют средой измерения активности (п. 2) и добавляют НАДН до конечной концентрации в кювете, равной 1 мМ. В кювету погружают отмытый рН-электрод, через 2—3 мин вносят 50 мкл суспензии Кейлина—Хартри (~25 мг/мл) и регистрируют изменение рН в ходе НАДН-оксидазной реакции. По ходу реакции в кювету вносят ротенон (0,1 мкМ) и наблюдают ингибирование ферментативной активности, связанное с образованием каталитически неактивного комплекса фермент·ротенон. Внося ингибитор в различных концентрациях (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15 мкМ), определяют зависимость скорости инактивации от концентрации ротенона и рассчитывают величину константы второго порядка скорости инактивации фермента ингибитором.

Определение константы скорости активации фермента, блокированного ротеноном. В стеклянную пробирку, стоящую на льду, вносят 1 мл суспензии Кейлина—Хартри (25 мг/мл). Измеряют НАДН-оксидазную активность, как указано выше. Измерение повторяют в среде, содержащей бычий сывороточный альбумин (20 мг/мл). После этого в инкубационную пробирку вносят 5 мкл ротенона из спиртового раствора и инкубируют 30 мин. Измеряют активность фермента в среде

без альбумина и убеждаются в инактивации комплекса I в результате инкубации с ротеноном. При измерении реакции с альбумином наблюдают быструю активацию заингибированного фермента во времени. Процесс активации обусловлен диссоциацией каталитически неактивного комплекса фермент·ротенон; альбумин, присутствующий в среде, связывает ротенон и смещает равновесие в сторону диссоциации комплекса фермент·ингибитор. Определяют константу первого порядка скорости активации заингибированного фермента в среде с альбумином. Предлагается, исходя из значений констант скоростей образования и распада комплекса, определить величину K_d комплекса фермент·ротенон.

Примечания. 1. При работе с ротеноном необходимо тщательно отмывать рН-электрод 50%-ным этиловым спиртом, а затем водой. 2. При измерении активности на рН-метре необходимо после завершения каждого измерения определять цену деления шкалы на самописце. Для этого в кювету вносят небольшой объем (0,02—0,05 мл) титрованной HCl (50 мМ) и фиксируют величину отскока пера самописца. 3. Ферментативную активность выражают в мкмольях окисленного НАДН за 1 мин в расчете на 1 мг белка препарата Кейлина—Хартри.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gutman M., Singer T. P., Caside J. E. Binding sites of rotenone, piericidin A and amytal in the respiratory chain//J. Biol. Chem. 1970. Vol. 245. P. 1992.
2. Suzuki H., King T. E. Evidence of an ubisemiquinone radical(s) from the NADH-ubiquinone reductase of the mitochondrial respiratory chain//J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 352.
3. Earley F. G. P., Ragan C. I. Photoaffinity labelling of mitochondrial NADN dehydrogenase with arylazidoamorphigenin an analogue of rotenone//Biochem. J. 1984. Vol. 224. P. 525.
4. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., 1966.

У. ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН И ТРАНСЛОКАЗНЫЕ РЕАКЦИИ В МИТОХОНДРИЯХ

1. ПЕРЕНОС ИОНОВ КАЛИЯ ЧЕРЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ МЕМБРАНУ

Внутренняя мембрана митохондрий обладает специфической проницаемостью для различных катионов и анионов. Это свойство делает митохондрии удобной моделью для изучения переноса веществ через биологические мембраны. Изолированные митохондрии содержат значительные количества катионов и анионов, причем количественно преобладает катион калия. При инкубации митохондрий в бескальциевой среде с помощью специального электрода удобно изучать основные закономерности переноса заряженной частицы через мембрану.

Рассмотрим процессы, происходящие при уравнивании концентрации ионов K^+ во вне- и внутримитохондриальном пространстве (рис. 53). Внутренняя мембрана митохондрий плохо проницаема для K^+ . Поэтому если митохондрии с высоким содержанием калия в матриксе поместить в бескальциевую среду, то калий в окружающей среде практически не появляется. Специфическую проницаемость мембраны для K^+ можно индуцировать антибиотиком валиномицином, представляющим собой циклический депептид с выраженными гидрофобными свойствами и способным к комплексообразованию с K^+ . Добавление к ми-

тохондриям валиномицина создает потенциальную возможность для выравнивания концентраций ионов K^+ по обе стороны мембраны. Если бы диффундируемые частицы не были заряжены, следовало бы ожидать практически полного перехода их во внешнюю среду (внутренним суммарным объемом митохондрий по сравнению с объемом внеш-

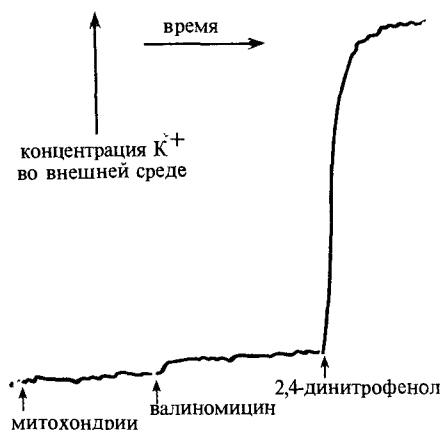


Рис. 53. Изменения концентрации K^+ в среде, регистрируемые с помощью K^+ -чувствительного электрода

ней среды можно пренебречь). Наличие у ионов K^+ электрического заряда уже при прохождении первых порций K^+ через мембрану создает потенциал, который уравнивает существующий градиент концентраций и останавливает движение катиона во внешнее пространство. Для поддержания процесса уравнивания концентраций необходимо одно из двух условий: движение отрицательно заряженных ионов из митохондрий в окружающее пространство либо движение положительно заряженных ионов из внешней среды в митохондрии. Оба процесса будут препятствовать возникновению диффузионного потенциала на мембране и обеспечат, таким образом, свободный выход иона K^+ . Для снятия электрического потенциала удобно воспользоваться 2,4-динитрофенолом, способным быстро диффундировать через мембрану как в ионизованном, так и в протонированном состоянии. Добавление динитрофенола обеспечит выход ионов K^+ из митохондрий в окружающую среду и перенос ионов H^+ в обратном направлении. При этом наблюдается быстрый выход K^+ из митохондрий. Результатом этого будет увеличение концентрации ионов H^+ внутри митохондрий, однако буферная емкость внутримитохондриального пространства достаточно велика для практически полной компенсации закисления.

Аналогичные рассуждения могут быть применены для рассмотрения переноса через мембраны других заряженных частиц, независимо от конкретного механизма их переноса.

В настоящей задаче предлагается экспериментально изучить процесс переноса K^+ через внутреннюю мембрану изолированных митохондрий печени крысы.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Среда инкубации: 0,15 М сахараза, 75 мМ холин-хлорид, 2,5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ трис- HCl , pH 7,4.
3. Валиномицин — $1 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этаноле.
4. 2,4-динитрофенол — $1 \cdot 10^{-2}$ М раствор pH 7,4.
5. $CaCl_2$ — $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор.
6. KCl — $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор.
7. Детергент (тритон-X-100) — 10%-ный раствор.
8. Ротенон — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этаноле.

Примечание. При приготовлении всех растворов следует тщательно избегать загрязнения их калиевыми солями. При необходимости доведения pH следует пользоваться 1 М раствором триса и pH-метром, электрод сравнения которого заполнен 0,1 М KCl .

Получают митохондрии печени крысы согласно описанию на с. 406. В кювету с постоянным перемешиванием, содержащую 3 мл среды инкубации, помещают K^+ -чувствительный электрод и, установив перо самописца на середину шкалы, калибруют чувствительность прибора внесением 4—6 добавок раствора KCl с точно известной концентрацией (по 20—30 мкМ). В другой пробе в среду инкубации вносят суспензию митохондрий (3—5 мг белка на 1 мл пробы), 5 мкМ ротенон и регистрируют в течение 1—2 мин концентрацию K^+ во внешней среде. В пробу добавляют валиномицин (около 0,1 нмоль на 1 мг белка), измеряют концентрацию ионов K^+ во внешней среде и рассчитывают скорость его диффузии в стационарном состоянии. Внесением 2,4-динитрофенола (100 мкМ) индуцируют выход ионов K^+ во внешнюю среду. Содержание эндогенного K^+ в митохондриях определяют добавлением к суспензии митохондрий в среде инкубации раствора детергента (тритон-X-100) до конечной концентрации 0,1%. Изменения концентрации K^+ в среде рассчитывают по калибровочной кривой.

Используя описанный методический подход, студентам предлагается самостоятельно провести следующие исследования.

1. Измерение скорости проникновения H^+ через мембрану intactных митохондрий.

2. Изучение ионообменных свойств митохондриальной мембраны (K^+ — Ca^{2+} -обмен) (см. п. 3 списка литературы).

3. Изучение зависимости проницаемости мембраны митохондрий для ионов K^+ от pH.

ЛИТЕРАТУРА

1. Финнеан Дж. Биологические ультраструктуры. М., 1970.
2. Massari S., Azzone G. F. The mechanism of ion translocation in mitochondria. 2. Active transport and proton pump//Europ. J. Biochem. 1970. Vol. 12. P. 310.
3. Scarpa A., Azzone G. F. The mechanism of ion translocation in mitochondria. 4. Coupling of K^+ efflux with Ca^{2+} uptake//Europ. J. Biochem. 1970. Vol. 12. P. 328.

2. ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ ДЛЯ РАСТВОРОВ ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Наружная и внутренняя мембраны митохондрий имеют неодинаковую проницаемость для различных веществ. Наружная мембрана легко проницаема для катионов, анионов и небольших незаряженных молекул, но препятствует проникновению крупных белковых молекул, на-

пример цитохрома *c*. Внутренняя мембрана непроницаема для многих катионов и анионов. Для проникающих ионов в мембране имеются специальные белки-переносчики. Пассивный перенос веществ через мембрану митохондрий в значительных количествах происходит только тогда, когда он не сопровождается образованием на мембране градиентов заряда или рН. Так, проникающий катион будет поступать в митохондрии по градиенту концентрации только в том случае, если в среде присутствует проникающий анион или если прохождение катиона внутрь митохондрий сопровождается выходом положительно заряженных частиц из внутримитохондриального пространства. Мембрана митохондрий проницаема для Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , фосфата и практически непроницаема для H^+ , K^+ , Cl^- и др. Ион аммония проникает в виде незаряженной молекулы аммиака. Предполагают, что ацетат проникает через внутреннюю мембрану в виде незаряженной молекулы кислоты, а фосфат — в виде моноаниона. Возможная схема проникновения в митохондрии соли $\text{NH}_4^+ \text{CH}_3\text{COO}^-$ показана на рис. 54. На рис. 55 дана схема прохождения через мембрану двузамещенного фосфата аммония.

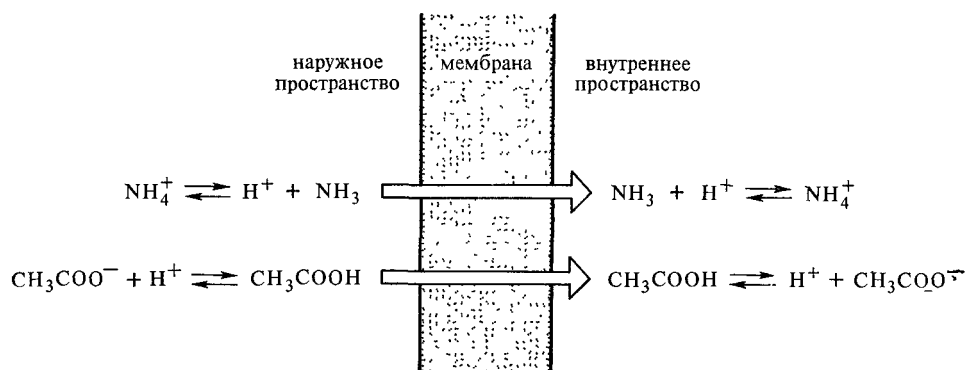


Рис. 54. Схема переноса аммиака и уксусной кислоты через внутреннюю мембрану митохондрий

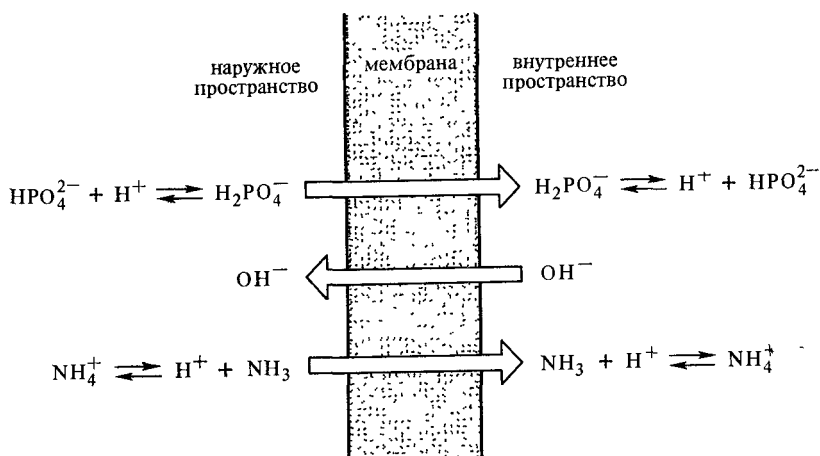


Рис. 55. Поглощение фосфата аммония митохондриями

Внутренняя митохондриальная мембрана свободно проницаема для воды. В отношении непроникающих веществ митохондрии ведут себя как идеальные осмометры, т. е. подчиняются уравнению:

$$V = K/C + V_{C \rightarrow \infty},$$

где V — объем митохондрий; K — константа; C — суммарная осмотическая концентрация раствора, в который помещены митохондрии; $V_{C \rightarrow \infty}$ — осмотически «мертвое» пространство, т. е. объем, который митохондрии занимают в среде с бесконечно большой осмотической концентрацией. Так как оптическая плотность суспензии митохондрий обратно пропорциональна объему взвешенных частиц, приведенное выше уравнение можно записать в виде

$$1/D = K_1/C + 1/D_{C \rightarrow \infty},$$

где D — оптическая плотность. Чем выше концентрация непроникающей через мембрану соли, тем меньше объем митохондрий, тем выше оптическая плотность их суспензии.

Таким образом, осмотическое поведение митохондрий можно изучать, измеряя поглощение света суспензий. При этом выбирают такую длину волны, чтобы ослабление света при прохождении через суспензию было обусловлено только рассеивающими свойствами митохондрий (520 нм). При такого рода исследованиях к митохондриям обычно добавляют ингибиторы дыхания, чтобы исключить влияние метаболических изменений объема на результаты измерений.

В задачу настоящей работы входит изучение осмотических свойств митохондрий печени крысы в растворах различных электролитов.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени (с. 406).
2. KCl и NH_4Cl — растворы следующих концентраций: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,40; 0,50; 0,75; 1,00 и 1,25 М.
3. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — растворы следующих концентраций: 0,066; 0,133; 0,200; 0,333; 0,500; 0,666 и 0,833 М.
4. Трис-HCl — 0,0012 М раствор (pH 7,2), готовят в день опыта.
5. Ротенон — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этиловом спирте.

Выделяют митохондрии печени (с. 406). В кювету спектрофотометра наливают дистиллированную воду и устанавливают нуль прибора при 520 нм. В другой кювете составляют смесь, состоящую из растворов 2,5 мл 0,0012 М трис-HCl (pH 7,2), 0,3 мл 0,05 М KCl, 0,02 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М ротенона, и содержимое хорошо размешивают. В кювету добавляют 0,2 мл суспензии митохондрий (2 мг белка) и после перемешивания измеряют оптическую плотность при 520 нм через 1, 2 и 3 мин после добавления митохондрий.

После измерения кювету тщательно промывают и заполняют той же средой, но с большей концентрацией KCl.

Аналогичным образом измеряют оптическую плотность в смесях, содержащих хлористый аммоний и фосфат аммония. Результаты оформляют в виде таблицы и строят графики зависимости оптической плотности D от концентрации вещества C , а также зависимости величины $1/D$ от $1/C$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chappell J. B., Haarrhoff K. N. The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations//Biochemistry of mitochondria. N. Y.; L. 1967. P. 75.

2. Stoner C. D., Sirak H. D. Osmotically-induced alterations in volume and ultra-structure of mitochondria isolated from rat liver and bovine heart//J. Cell Biol. 1969. Vol. 43. P. 521.
3. Tedeschi H., Harris D. L. Some observations on the photometric estimation of mitochondrial volume//Biochim. Biophys. Acta, 1958. Vol. 28. P. 392.

3. ПАССИВНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ДЛЯ АНИОНОВ

Обмен метаболитами (интермедиатами цикла трикарбоновых кислот, неорганическим фосфатом и некоторыми аминокислотами) между внутренним митохондриальным пространством и цитоплазмой катализируется специальными ферментами, получившими название переносчиков.

Экспериментально доказано существование по крайней мере трех индивидуальных переносчиков, катализирующих электронейтральный обмен фосфата на анионы дикарбоновых кислот, α -кетоглутарата — на анионы дикарбоновых кислот и анионов трикарбоновых кислот — на анионы дикарбоновых кислот. С участием специфических переносчиков осуществляется транспорт неорганического фосфата и глутамата в митохондриях. Субстратом переносчика фосфата в митохондриях является моноанион фосфорной кислоты, и распределение фосфата по обе стороны мембраны зависит от величины градиента рН. Таким образом, градиент рН, генерируемый на мембране в результате работы дыхательной цепи или АТФ-азы митохондрий, реализуется в градиент концентрации фосфата, а последний, в свою очередь, является движущей силой в перераспределении анионов ди- и трикарбоновых кислот.

Внутренняя мембрана митохондрий проницаема для аммиака, кислорода, углекислого газа, воды, пирувата, ацетата и других монокрбоновых кислот. По-видимому, перенос этих веществ происходит в результате простой диффузии незаряженных молекул. Перенос во внутреннее пространство митохондрий молекул недиссоциированной уксусной кислоты должен, как и в случае фосфата, привести к изменениям рН по обе стороны мембраны в соответствии с законом действующих масс.

Цель настоящей работы — выявление проникающей через внутреннюю мембрану митохондрий формы ряда неорганических и органических анионов с использованием осмотического метода (с. 446). Осмотическое поведение митохондрий зависит не от состава наружного раствора, а от способности входящих в его состав веществ проникать в митохондрии. При помещении митохондрий в изотонические растворы солей различных анионов с проникающими катионами (NH_4^+ или K^+ в присутствии валиномицина) по изменению величины оптической плотности можно судить о проницаемости мембраны для данного аниона. В качестве точки отсчета можно использовать величину оптической плотности суспензии митохондрий в изотоническом растворе KCl (митохондриальная мембрана практически непроницаема для ионов K^+ и Cl^-).

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий (с. 406).
2. KCl , NH_4CNS , NH_4NO_3 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, KCNS , CH_3COOK , сукцинат аммония, малат аммония, цитрат аммония, фумарат аммония — 0,6 М растворы. Аммониевые соли субстратов цикла Кребса готовят нейтрализацией свободных кислот

аммиаком, контролируя рН растворов солей потенциметрически.

3. 2,4-динитрофенол — 0,01 М раствор, рН 7,2.
4. Раствор антимицина А — 0,4 мг/мл (в перегнанном этаноле).
5. ЭДТА — 0,01 М раствор, рН 7,2.
6. Трис-НСl — 0,06 М раствор (рН 7,2), готовят в день опыта.
7. Ротенон — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этаноле.
8. Валиномицин — 10^{-5} М раствор в перегнанном этаноле.

Выделяют митохондрии (с. 406). С полученным препаратом проводят следующие исследования.

1. В кювету спектрофотометра наливают дистиллированную воду и устанавливают нуль прибора при 520 нм. В другой кювете составляют смесь, содержащую 2,5 мл 0,006 М трис-НСl (рН 7,2), 0,03 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М ротенона (среда инкубации № 1) и 0,3 мл 0,6 М КСl. Содержимое хорошо перемешивают и измеряют оптическую плотность при 520 нм через 0,5, 1, 2 и 3 мин после добавления митохондрий (2 мг белка).

2. Кювету заполняют средой инкубации № 1 и добавляют 0,3 мл 0,6 М раствора $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Прибавив суспензию митохондрий, тщательно перемешивая ее, регистрируют падение оптической плотности по сравнению с раствором КСl.

Ставят аналогичную пробу с раствором $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

3. Проба содержит среду инкубации № 1 и 0,3 мл 0,6 М раствора NH_4CNS . В течение 2 мин после добавления митохондрий регистрируют величину оптической плотности, затем в кювету с помощью микропипетки приливают 2,4-динитрофенол в конечной концентрации 15 мкМ и в течение 3 мин регистрируют оптическую плотность. В следующих пробах концентрацию разбавителя увеличивают (30, 60, 100 и 130 мкМ). Убеждаются в том, что падение оптической плотности увеличивается с увеличением концентрации 2,4-динитрофенола. Ставят аналогичные пробы с NH_4NO_3 .

4. Кювета содержит среду № 1 и 0,3 мл 0,6 М раствора KCNS . В течение 2 мин после добавления митохондрий регистрируют оптическую плотность, затем добавляют валиномицин и в течение 3—4 мин регистрируют падение оптической плотности.

5. Кювета содержит среду инкубации № 1 и 0,3 мл 0,6 М раствора CH_3COOK . В течение 2 мин после добавления митохондрий регистрируют оптическую плотность, затем добавляют валиномицин и через 2 мин — 100 мкМ 2,4-динитрофенол. В течение 3—4 мин регистрируют падение оптической плотности.

Делают выводы относительно проникающей формы исследованных анионов.

6. Проба содержит смесь растворов: 2,5 мл 0,006 М трис-НСl (рН 7,2), 0,03 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М ротенона, 0,03 мл 0,01 М ЭДТА, 0,03 мл антимицина А (среда инкубации № 2) и 0,3 мл 0,6 М сукцината аммония. В течение 2 мин после добавления митохондрий регистрируют оптическую плотность, затем добавляют 2 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и регистрируют падение оптической плотности еще 3 мин. Аналогичным образом ставят пробу с 0,6 М раствором малата аммония.

7. Проба содержит среду инкубации № 2 и 0,3 мл 0,6 М раствора цитрата аммония. Регистрируют оптическую плотность в течение 2 мин после добавления митохондрий, затем добавляют 2 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и еще через 2 мин — 2 мМ малата аммония. Регистрируют оптическую

плотность еще 3—4 мин. Аналогичным образом ставят пробу с 0,6 М раствором фумарата аммония. Делают вывод относительно проницаемости субстратов цикла Кребса через внутреннюю мембрану митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

Chappell J. B., Haarhoff K. N. The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations//Biochemistry of mitochondria. N. Y.; L., 1967. P. 75.

4. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ Ca^{2+} В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

Энергия, освобождающаяся при окислении субстратов и последующем переносе электронов в дыхательной цепи, используется не только на синтез АТФ, но и для осуществления других функций митохондрий, например для активного транспорта ионов Ca^{2+} через митохондриальную мембрану. Если к суспензии аэробно инкубируемых митохондрий в присутствии субстрата добавить некоторое количество ионов Ca^{2+} (в виде какой-либо его соли), то по истечении небольшого промежутка времени весь добавленный Ca^{2+} оказывается во внутримитохондриальном пространстве. В процессе активного транспорта создается и поддерживается высокий концентрационный градиент ионов Ca^{2+} по обе стороны митохондриальной мембраны. Когда функционирование дыхательной цепи полностью заблокировано, транспорт Ca^{2+} может обеспечиваться за счет энергии гидролиза АТФ.

В настоящей работе предлагается познакомиться с основными закономерностями активного транспорта Ca^{2+} и связью этого процесса с метаболической функцией митохондрий печени крысы.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Сахароза — 0,3 и 0,88 М растворы.
3. Фосфат калия — 0,5 М раствор, pH 7,4.
4. MgCl_2 — 0,5 М раствор.
5. Сукцинат калия — 1 М раствор, pH 7,4.
6. Среда инкубации: 0,15 М сахароза, 0,075 М KCl, 0,005 М фосфат калия (pH 7,4), 2,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ сукцинат.
7. 2,4-динитрофенол — 0,01 М раствор, pH 7,4.
8. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор.
9. Цианистый калий (внимание, яд! Все работы необходимо проводить согласно инструкции) — 0,2 М раствор, pH 8,0 (pH раствора цианида доводить осторожно 0,1 н. HCl, проверяя pH по индикаторной бумаге).
10. CaCl_2 — 0,1 М раствор (титрование см. на с. 484).
11. Мурексид — NaCl (смесь сухих солей в отношении 1:100).
12. ЭДТА — 0,1 М раствор, pH 7,4.
13. NaOH — 1 М раствор.
14. NaOH — концентрированный.
15. Реактивы для определения белка (с. 483).

Получают суспензию митохондрий печени крысы (с. 406).

В четырех конических колбочках на 25 мл готовят инкубационные смеси по следующей схеме:

№ пробы	Среда инкубации, мл	CaCl ₂ *, 1 мМ	2,4 динитрофенол*, 100 мкМ	KCN*, 2 мМ
1	3,0	—	—	—
2	3,0	+	—	—
3	3,0	+	+	—
4	3,0	+	—	+

* Указаны конечные концентрации. Добавляемые объемы не должны превышать 1—2% от общего объема смеси.

В каждую из них добавляют по 0,2 мл густой суспензии митохондрий (20—25 мг белка) и пробы инкубируют в течение 3 мин при комнатной температуре. Митохондрии отделяют от среды инкубации быстрым центрифугированием суспензии в 0,88 М раствора сахарозы. Предварительно охлажденную до 0° С сахарозу разливают по 7 мл в 4 центрифужные пробирки от супернасадки ЦЛР-1, стоящие на льду. После инкубации колбы быстро охлаждают и их содержимое осторожно с помощью пипетки насаивают на поверхность раствора 0,88 М сахарозы. Осторожно помещают пробирки в охлажденный ротор супернасадки и центрифугируют при максимальной скорости вращения (18000 об/мин) в течение 10 мин. Верхний слой отсасывают пипеткой, а раствор сахарозы сливают. Добавляют в центрифужные стаканчики по 1,5 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты, осадки тщательно размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют при 5000 g 10 мин. Супернатанты собирают в пробирки и экстракцию повторяют еще раз. Объединенные супернатанты нейтрализуют концентрированным раствором NaOH, добавляют 1 мл 1 М раствора NaOH и объем доводят до 10 мл бидистиллированной водой. Прибавляют индикатор (смесь мурексиды с NaCl) и тотчас титруют раствором ЭДТА до перехода окраски в фиолетовую. Определение Ca²⁺ см. на с. 484. Рассчитывают количество Ca²⁺ в митохондриях печени крысы и его изменения в ходе инкубации в различных условиях. Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Митохондрии. М., 1968.
2. Lehninger A. L., Carafoli E., Rossi C. S. Energy-linked ion movement in mitochondria//Adv. in Enzymol. 1967. Vol. 29. P. 259.
3. Lehninger A. L. Mitochondria and calcium ion transport. The fifth jubilee lecture//Biochem. J. 1970. Vol. 119. P. 129.

5. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА КАЛЬЦИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

Митохондрии активно транспортируют ионы Ca²⁺ и некоторых других двухвалентных металлов. Добавление Ca²⁺ (200—300 нмоль/мг белка) к аэробной суспензии митохондрий в присутствии субстрата окисления вызывает стимуляцию дыхания. Когда практически весь добавленный Ca²⁺ окажется во внутреннем пространстве митохондрий, скорость потребления кислорода возвращается к исходному уровню (конт-

ролируемое состояние). Отношение количества добавленного Ca^{2+} к количеству поглощенного кислорода (Ca/O) варьирует от 4 (при окислении сукцината — два пункта сопряжения) до 6 (при окислении НАД-зависимых субстратов — три пункта сопряжения). Отношение величины Ca/O к величине АДФ/О для одного и того же митохондриального препарата характеризует количество ионов Ca^{2+} , проходящее через мембрану за счет энергии переноса двух электронов через один пункт сопряжения в дыхательной цепи.

Значительные количества Ca^{2+} могут быть накоплены в митохондриях только в присутствии проникающего аниона в среде инкубации, например фосфата или ацетата. Перенос фосфата через мембрану осуществляется с помощью специфического фермента-переносчика, активность которого подавляется низкими концентрациями SH-ядов. В присутствии сульфидрильных ядов митохондрии неспособны к окислительному фосфорилированию и накапливают очень ограниченное количество Ca^{2+} . Добавление АДФ или Ca^{2+} в таких условиях не стимулирует дыхания. Последующее добавление ацетата, перенос которого нечувствителен к этим ядам, стимулирует дыхание и обеспечивает транспорт добавленного ранее Ca^{2+} во внутреннее пространство митохондрий.

К специфическим ингибиторам переносчика Ca^{2+} в мембране относится комплексная соль рутения $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}]\text{Cl}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, используемая в гистохимической практике в качестве красителя на мукополисахариды (рутениевый красный). Присутствие последнего не влияет на дыхание и окислительное фосфорилирование, но полностью исключает стимуляцию дыхания при добавлении Ca^{2+} . В таких условиях Ca^{2+} остается во внемитохондриальном пространстве.

В настоящей работе предлагается ознакомиться с основными функциональными особенностями системы активного транспорта Ca^{2+} в митохондриях.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Сахароза — химически чистый препарат.
3. KH_2PO_4 — 0,5 М раствор, pH 7,4.
4. Ацетат калия — 2 М раствор, pH 7,4.
5. Сукцинат калия — 1 М раствор, pH 7,4.
6. Смесь 0,5 М глутамата и 0,5 М малата калия, pH 7,4.
7. 2,4-динитрофенол — 0,01 М раствор, pH 7,4.
8. Рутениевый красный — $1 \cdot 10^{-4}$ М раствор.
9. *n*-Хлормеркурибензоат — $4 \cdot 10^{-3}$ М раствор, pH 7,4.
10. АДФ — $3 \cdot 10^{-2}$ М раствор, pH 7,4.
11. CaCl_2 — $5 \cdot 10^{-2}$, $4 \cdot 10^{-2}$, $3 \cdot 10^{-2}$, $2 \cdot 10^{-2}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ М растворы.
12. MgCl_2 — 0,25 М раствор.
Растворы CaCl_2 и MgCl_2 готовят разведением титрованных растворов.
13. KCl — 1 М раствор.
14. Ротенон — $3 \cdot 10^{-4}$ М раствор в этиловом спирте. При использовании сукцината в качестве субстрата окисления все пробы должны содержать 3 мкМ ротенона (добавлять непосредственно в кювету).
15. НАД⁺ — 100 мМ раствор.

Измерение активного транспорта Ca^{2+} в митохондриях. В день опыта готовят две среды инкубации (по 50 мл) следующего состава:

(1) — 0,15 М сахараза, 0,075 М KCl, 2,5 мМ MgCl₂ и 5 мМ KH₂PO₄ (рН 7,4); (2) — 0,15 М сахараза, 0,075 М KCl, 2,5 мМ MgCl₂, 20 мМ ацетат калия и 10 мМ трис-HCl (рН 7,4).

Отмытые и подсушенные с помощью кусочка фильтровальной бумаги электроды полярографа осторожно опускают в кювету, заполненную 2 мл среды 1 (проба 1) до полного выхода пузырька воздуха. С помощью специального потенциометра устанавливают перо включенного самописца в исходное положение, соответствующее исходной концентрации кислорода в среде (в самописцах типа КСП-4 — в крайнее правое положение). Включают движение диаграммной ленты и, убедившись в отсутствии дрейфа, с помощью микропипетки добавляют в кювету 0,04—0,05 мл густой суспензии митохондрий (4—6 мг белка). В течение 40—60 с регистрируют медленное эндогенное дыхание и добавляют 0,02 мл сукцината (10 мМ), который вызывает небольшую стимуляцию дыхания. Через 40—60 с в кювету вносят раствор CaCl₂ (~100 мкМ). При этом дыхание сначала резко активируется, затем быстро снижается до исходного уровня. Добавку повторяют несколько раз до тех пор, пока стимуляция дыхания после каждого добавления сменяется четко выраженным торможением. Учитывая количество добавленного CaCl₂, оценивают его максимальную концентрацию, вызывающую обратимую стимуляцию дыхания. Для препарата интактных прочно сопряженных митохондрий (4—6 мг белка в кювете) эта концентрация обычно составляет 400—500 мкМ. В пробе 2 убеждаются в том, что выбранная концентрация CaCl₂ вызывает обратимую стимуляцию дыхания с отчетливым выходом в контролируемое состояние. Для определения величины АДФ/О записывают следующую пробу. С этой целью в кювету со средой последовательно добавляют митохондрии, сукцинат и АДФ в концентрации от 300 до 400 мкМ (определение АДФ/О см. на с. 462). Проводят три аналогичных измерения с использованием в качестве субстрата окисления смесь глутамат—малат (по 5 мМ). В этом случае целесообразно уменьшить концентрацию добавляемого CaCl₂ в 1,5—2 раза, а в среду инкубации предварительно добавить (непосредственно в кювету) 1 мМ НАД⁺ для предотвращения утечки эндогенных пиридиннуклеотидов.

Отношение Са/О рассчитывают аналогично тому, как описано на с. 462 для коэффициента АДФ/О. Полученные данные представляют в виде таблиц и документируют полярограммами.

Ингибиторы транспорта кальция. В работе предлагается ознакомиться с некоторыми особенностями системы аккумуляции Ca²⁺ в митохондриях. С этой целью ставят серию проб по следующей схеме.

Проба 1. В среду 1 добавляют митохондрии (4—6 мг белка), сукцинат (10 мМ), 2,4-динитрофенол (50 мкМ) и определяют сукцинатоксидазную активность препарата.

Проба 2. В среду 1, содержащую 30 мкМ *n*-хлормеркурибензоат (добавить непосредственно в кювету), добавляют митохондрии, сукцинат, CaCl₂ (в концентрации приблизительно 400 мкМ), АДФ (300—400 мкМ) и 50 мкМ 2,4-динитрофенол. Убеждаются в том, что *n*-хлормеркурибензоат ингибирует аккумуляцию Ca²⁺ и окислительное фосфорилирование, но не влияет на сукцинатоксидазную активность митохондрий.

Проба 3. В среду 2, содержащую 30 мкМ *n*-хлормеркурибензоат добавляют митохондрии, сукцинат, CaCl₂ и 2,4-динитрофенол. Убеждаются в том, что в присутствии ацетата *n*-хлормеркурибензоат не влияет на транспорт Ca²⁺ и сукцинатоксидазную активность.

Проба 4. В среду 1, содержащую *n*-хлормеркурибензоат, добавляют митохондрии, сукцинат, CaCl_2 , 20 мМ ацетат, 2,4-динитрофенол (для быстрого истощения кислорода в среде). Убеждаются в том, что ацетат снимает вызванное *n*-хлормеркурибензоатом торможение транспорта Ca^{2+} .

Проба 5. В среду 1, содержащую 1 мкМ рутениевый красный (добавить непосредственно в кювету), добавляют митохондрии, сукцинат и 2,4-динитрофенол. Убеждаются в отсутствии чувствительности сукцинатоксидазной активности митохондрий к рутениевому красному.

Проба 6. В среду 1, содержащую рутениевый красный, добавляют митохондрии, сукцинат, CaCl_2 , АДФ и 2,4-динитрофенол. Убеждаются в том, что рутениевый красный полностью блокирует активный транспорт Ca^{2+} и не влияет на окислительное фосфорилирование.

Проба 7. Повторяют пробу 6 в среде 2 (плюс рутениевый красный). Убеждаются в том, что ингибирующее действие рутениевого красного не зависит от природы сопровождающего аниона.

Проба 8. В среду 1 добавляют митохондрии, сукцинат, 200 мкМ CaCl_2 . После выхода в контролируемое состояние добавляют 30 мкМ *n*-хлормеркурибензоат и вслед за ним — еще 200 мкМ CaCl_2 . Убеждаются в отсутствии стимуляции дыхания после второй добавки CaCl_2 . Добавляют 20 мМ ацетат и наблюдают обратимую стимуляцию дыхания, связанную с поглощением добавленного ранее кальция. В кювету вносят 1 мкМ рутениевый красный и вслед за ним еще 200 мкМ CaCl_2 и 2,4-динитрофенол. Вновь убеждаются в торможении активного транспорта Ca^{2+} при неизменной сукцинатоксидазной активности митохондрий. Полученные данные анализируют с учетом природы ингибирующего действия *n*-хлормеркурибензоата и рутениевого красного на активный транспорт Ca^{2+} в митохондриях. Данные оформляют в виде полярограмм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chance B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria//J. Biol. Chem. 1965. Vol. 240. P. 2729.
2. Fonyo A., Ligeti E. The role of intramitochondrial inorganic phosphate in stimulation of respiration by calcium and strontium//FEBS Lett. 1978. Vol. 93. P. 289.
3. Saris N. E. L., Akerman K. E. O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria//Curr. Top. Bioenerg. 1980. Vol. 10. P. 103.
4. Moore C. L. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971. Vol. 42. P. 298.

6. СПЕЦИФИЧНОСТЬ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА КАЛЬЦИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

Изучение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для ионов Ca^{2+} привело к представлению о существовании в митохондриях специфической транспортной системы. Ее активность ингибируется низкими концентрациями рутениевого красного, катионов семейства лантанидов и гексаминокобальта. Транспорт Ca^{2+} специфически ингибируется антителами на митохондриальный гликопротеин, который может быть легко экстрагирован из митохондрий с помощью осмотического шока в присутствии ЭДТА. Иммунологические данные не оставляют сомнений в участии этого гликопротеина (м. м. 33 000 Да) в связывании и (или) переносе Ca^{2+} через мембрану. Система транспорта Ca^{2+} в митохондриях катализирует также зависимое от энергии поглощение других двухвалентных катионов, но ее специфичность па-

дает в ряду: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$. Кроме того, эта система может быть ответственна за очень быстрый и чувствительный к рутениевому красному трансмембранный перенос ионов H^+ в митохондриях в специальных условиях.

Интересным свойством этой системы является то, что небольшие количества Ca^{2+} не только резко ускоряют поглощение ионов Mn^{2+} в митохондриях, но и существенно изменяют ее кинетическое поведение при взаимодействии с Mn^{2+} в качестве субстрата. Это явление получило новое объяснение после того, как было показано, что Ca^{2+} служит не только субстратом рассматриваемой транспортной системы, но и с высокой эффективностью регулирует ее активность.

В настоящей работе предлагается изучить специфичность Ca^{2+} -транспортирующей системы митохондрий печени крысы и роль Ca^{2+} в регуляции проницаемости внутренней мембраны для двухвалентных катионов.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Среда инкубации, содержащая 0,15 М сахарозу, 75 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl_2 и 5 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4 — 50 мл.
3. Сукцинат калия — 1 М раствор, pH 7,4.
4. Ротенон — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этаноле.
5. Рутениевый красный — 10^{-5} М раствор.
6. CaCl_2 , SrCl_2 , MnCl_2 и BaCl_2 — 10^{-1} М растворы. Если для приготовления раствора CaCl_2 используется крайне гигроскопичный гексагидрат CaCl_2 , то концентрацию Ca^{2+} в растворе определяют комплексонометрически титрованием с подходящим металлохромным индикатором (с. 484).
7. HCl и KOH — 10^{-2} М растворы. Готовят разведением титрованных растворов HCl и KOH.
8. Регистрирующий pH-метр или полярограф с наборами кювет.
9. Набор автоматических и стеклянных микропипеток объемом 10—20 мкл (8—10 шт.) и 40—60 мкл (1 шт.).

Перед выделением митохондрий и проведением работы из 10^{-1} М растворов двухвалентных катионов готовят серию разведений, которая с учетом имеющегося набора микропипеток обеспечила бы возможность вариации конечных концентраций катионов в среде в диапазоне от 20—30 мкМ до 0,5—1,0 мМ (5—6 разведений).

Так как в процессе активного транспорта катионов происходят активация дыхания и закисление среды инкубации, для выполнения работы может быть использована как полярографическая, так и pH-метрическая техника. Из-за трудностей, которые могут возникнуть при изменении скорости дыхания в присутствии низких концентраций катионов, предпочтение следует отдать pH-метрической технике для регистрации кинетики транспортного процесса.

В кювету pH-метра со средой, содержащей 10 мМ сукцинат и 5 мкМ ротенон, в которую погружены электроды, добавляют порцию митохондрий (3—4 мг белка) и регистрируют стационарную концентрацию ионов H^+ . Через 1 мин (когда вызванные добавлением митохондрий изменения pH среды прекратятся) в кювету добавляют 20 мкМ Ca^{2+} и регистрируют закисление среды до нового стационарного значения pH. После этого в кювету добавляют 1—2 раза 50—100 мкМ HCl или KOH для калибровки шкалы. Проводят серию ана-

логичных проб с последовательно возрастающей концентрацией Ca^{2+} (5—6 проб с концентрацией Ca^{2+} в диапазоне от 20 до 200 мкМ). В пробе с максимальной концентрацией Ca^{2+} убеждаются в том, что скорость вызванного его добавлением закисления среды не совпадает со скоростью ответа электродов на добавление HCl или KOH . В противном случае следует уменьшить концентрацию белка митохондрий во всех пробах. Проводят три серии аналогичных опытов, в которых измеряют концентрационную зависимость скорости активного транспорта Sr^{2+} , Mn^{2+} и Ba^{2+} в митохондриях в тех же условиях. Количественно оценивают специфичность исследуемого процесса в отношении двухвалентных катионов.

Во второй части работы проводят четыре серии таких же опытов, однако перед измерением соответствующей активности митохондрии предварительно «нагружают» небольшим количеством Ca^{2+} (10—20 нмоль Ca^{2+} /мг белка). Вновь оценивают специфичность исследуемой транспортной системы в отношении катионов и сравнивают полученные данные с результатами первой части работы. В одном из проводимых для каждого катиона измерений убеждаются в том, что процесс его активного транспорта в митохондриях блокируется рутениевым красным (10^{-7} М).

ЛИТЕРАТУРА

1. Selwyn M. J., Dawson A. P., Dunnett S. J. Calcium transport in mitochondria//FEBS Lett. 1970. Vol. 10. P. 1.
2. Moore C. L. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971. Vol. 42. P. 298.
3. Mela L. Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria. Effect of lanthanides and local anesthetic drugs//Biochemistry. 1969. Vol. 8. P. 2481—2486.
4. Tashmukhamedov B. A., Gagelgans A. I., Mamatkulov Kh. et al. Inhibition of Ca^{2+} transport in mitochondria by selective blocage of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltchloride//FEBS Lett. 1972. Vol. 28. P. 239.
5. Ligeti E., Bodnar J., Keroly E. et al. Ni^{2+} , a new inhibitor of mitochondrial calcium transport//Biochim. Biophys. Acta. 1981. Vol. 656. P. 177—182.
6. Sandri G., Sottocasa G., Panfili E. et al. The ability of the mitochondrial Ca^{2+} -binding glycoprotein to restore Ca^{2+} transport in glycoprotein-depleted rat liver mitochondria//Biochim. Biophys. Acta. 1979. Vol. 558. P. 214.
7. Sandri G., Panfili E., Sottocasa G. The calcium-binding glycoprotein and mitochondrial calcium movement//Biochem. Biophys. Res. Comm. 1976. Vol. 68. P. 1272.
8. Vainio H., Mela L., Chance B. Energy-dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria//Europ. J. Biochem. 1970. Vol. 12. P. 387.
9. Зиновьева М. В., Лейкин Ю. Н., Петушкова Н. А. Природа эндогенной протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий. Участие Ca^{2+} -транспортной системы в переносе протона//Биохимия, 1981. Т. 46, № 10. С. 1896.
10. Vinogradov A., Scarpa A. The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria//J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248. P. 5527.
11. Лейкин Ю. Н., Гонсалвес М. П. П. Внемитохондриальный Ca^{2+} контролирует активность Ca^{2+} -транспортной системы митохондрий//Докл. АН СССР. 1986. Т. 290, № 4. С. 1011.

7. НАКОПЛЕНИЕ ИОНОВ Mg^{2+} МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

В обычных условиях митохондрии практически непроницаемы для ионов H^+ , K^+ , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} и ряда незаряженных молекул сахарозы и других углеводов. В специальных условиях митохондрии способны накапливать значительные количества ионов, при этом concentra-

ция некоторых из них во внутримитохондриальном пространстве становится значительно большей, чем в окружающей среде. Существование концентрационного градиента требует свободной энергии для его образования, источником которой могут быть гидролиз АТФ и окислительно-восстановительные реакции дыхательной цепи. К числу ионов, активно накапливающихся в митохондриях, относятся Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , фосфат, ацетат, анионы субстратов цикла Кребса и др. Для накопления ионов против градиента концентраций необходимо выполнение трех условий: 1) проницаемость мембраны для заряженной частицы (диффузия или специальный переносчик); 2) наличие источника свободной энергии; 3) электронейтральность процесса переноса ионов.

Первое условие выполняется для ряда веществ, участвующих в реакциях, локализованных во внутримитохондриальном пространстве (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Второе условие может быть выполнено, если в среде присутствует АТФ или митохондрии инкубируются в аэробных условиях в присутствии субстрата окисления. Третье условие требует существования сопряженной обменной реакции (рис. 56), где X — заряженная частица, компенсирующая возникающий электрический потенциал, либо одновременного переноса катиона и аниона во внутреннюю зону митохондрий (рис. 57).

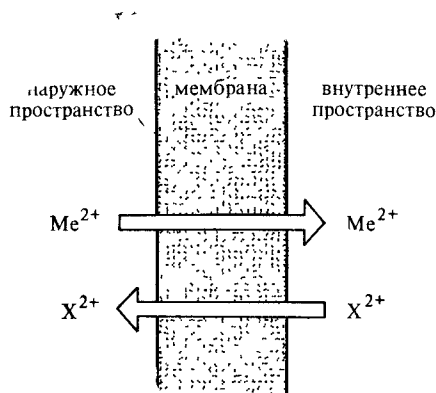


Рис. 56. Электронейтральный обмен (антипорт) катионов через мембрану

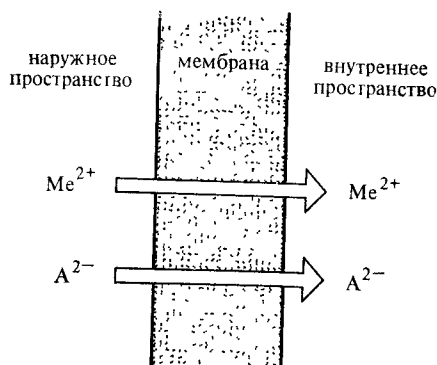


Рис. 57. Электронейтральный перенос катиона и аниона (симпорт) через мембрану

Исследования аккумуляции катионов в митохондриях обычно проводят в присутствии проникающего аниона (чаще всего фосфата). В этом случае во внутримитохондриальном пространстве накапливается фосфорнокислая соль транспортируемого катиона.

В задачу настоящей работы входит изучение аккумуляции ионов Mg^{2+} митохондриями сердечной мышцы крысы.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий сердечной мышцы (с. 405).
2. Сахароза — 0,3 М раствор.
3. Фосфат калия — 0,5 М раствор, pH 7,4.
4. $MgCl_2$ — 0,5 М раствор.

5. Сукцинат калия — 0,1 М раствор, рН 7,4.
 6. 2,4-динитрофенол — 0,01 М раствор, рН 7,4.
 7. Сахароза — 0,88 М раствор.
 8. Хлорная кислота — 1 н. раствор.
 9. Метиловый спирт.
 10. Аммиачный буфер — 1 М раствор, рН 9,5.
 11. Аммиак — концентрированный раствор.
 12. Цианистый калий — 12%-ный раствор готовят перед употреблением.
- Осторожно яд! Работать в соответствии с инструкцией!**
13. Эриохром черный Т — 0,1%-ный раствор, готовят перед употреблением.
 14. MgCl_2 — 0,3 мкмоль/мл, стандартный раствор.

Выделяют митохондрии сердца (см. с. 405). После осаждения из гомогената осадок митохондрий промывают 0,3 М раствором сахарозы и суспендируют в том же растворе.

В четыре конические колбочки на 25 мл наливают по 3 мл среды инкубации одного из следующих составов: 1) 0,3 М сахароза; 2) 0,25 М сахароза, 3 мМ фосфат калия (рН 7,4), 15 мМ MgCl_2 , 10 мМ трис- HCl буфер (рН 7,4), 5 мМ сукцинат калия; 3) то же, что (2), но без фосфата; 4) то же, что (2), плюс 100 мкМ 2,4-динитрофенол.

Среды инкубации, содержащие трис, готовят в день опыта непосредственно перед использованием.

Колбочки помещают в термостат аппарата Варбурга при 28°С и выравнивают температуру в течение 15 мин. В каждую колбочку добавляют по 0,1 мл густой суспензии митохондрий (6—7 мг белка) и пробы инкубируют в течение 10 мин при перемешивании. По окончании инкубации их помещают в лед и после быстрого охлаждения их содержимое осторожно настилают на поверхность холодного 0,88 М раствора сахарозы. Предварительно охлажденную до 0°С сахарозу разливают по 5—7 мл в четыре центрифужных стаканчика от супернатанки центрифуги ЦЛР, стоящие во льду. Пробы центрифугируют при максимальной скорости вращения 10 мин. Верхний слой отсасывают пипеткой и отбрасывают, раствор сахарозы сливают и поверхность осадков осторожно споласкивают 0,3 М сахарозой, охлажденной до 0°С. В стаканчик добавляют по 1,5 мл 1 н. хлорной кислоты, осадки хорошо размешивают стеклянной палочкой и центрифугируют при 5000 g в течение 15 мин. Супернатанты собирают в пробирки и экстракцию повторяют вновь в тех же условиях. Объединенные супернатанты нейтрализуют крепким раствором NH_4OH . К нейтрализованным растворам добавляют по 2 мл метилового спирта, 2,5 мл 1 М аммиачного буфера, 0,2 мл раствора цианистого калия и 0,4 мл раствора эриохрома черного Т в метиловом спирте. Объем доводят до 10 мл аммиачным буфером. Определяют количество Mg^{2+} в пробах, измеряя оптическую плотность при 520 нм против раствора, не содержащего Mg^{2+} . Калибровочную кривую строят одновременно с обработкой опытных проб, используя в качестве стандарта титрованный раствор MgCl_2 . Область концентраций, в которой сохраняется линейная зависимость между количеством Mg^{2+} и оптической плотностью, — 0—0,3 мкмоль Mg^{2+} на пробу.

По результатам измерения рассчитывают количество Mg^{2+} в митохондриях сердечной мышцы и его изменения при инкубации в различных условиях. Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

Brierley G., Murer E., Bauchmann E., et al Studies ion transport. II. The accumulation of inorganic phosphate and magnesium ions by heart mitochondria//J. Biol. Chem. 1963. Vol. 238. P. 3482.

8. ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ТРАНСПОРТА НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА В МИТОХОНДРИЯХ

Высокая специфичность внутренней мембраны в отношении проницаемости для разных веществ привела к представлению о существовании в ней ферментов-переносчиков. Так как многие субстраты ферментов, локализованных внутри митохондрий, при физиологических значениях рН являются ионами (нуклеотиды, субстраты цикла трикарбоновых кислот, неорганический фосфат, катионы и т. д.), представляет интерес идентификация ионных форм транспортируемых веществ. Такие данные важны для понимания конкретного механизма переноса субстрата через мембрану.

Одним из процессов, сопровождающихся переносом неорганического фосфата через мембрану митохондрий, является активный транспорт кальция. Значительные количества Ca^{2+} могут быть аккумулированы митохондриями за счет энергии дыхания только в присутствии проникающих через мембрану анионов. В этом случае активация дыхания при добавлении Ca^{2+} приводит к накоплению во внутримитохондриальном пространстве соответствующих проникающему аниону кальциевых солей. Таким образом, активный транспорт Ca^{2+} сопровождается переносом через мембрану аниона. В физиологических условиях роль такого аниона выполняет неорганический фосфат.

В настоящей работе предлагается провести анализ кинетики переноса неорганического фосфата, сопровождающего активный транспорт Ca^{2+} .

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Среда инкубации для опыта 1: 0,15 М сахароза, 75 мМ KCl, 10 мМ сукцинат, 3 мкМ ротенон, 10 мМ трис-HCl и 0,5 мМ KH_2PO_4 . Готовят несколько сред с различными значениями рН в диапазоне от 6,8 до 8,2 (6—7 точек).
3. Среда инкубации для опыта 2: 0,15 М сахароза, 75 мМ KCl, 10 мМ сукцинат, 3 мкМ ротенон, 10 мМ трис-HCl и KH_2PO_4 в концентрациях от $5 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ М (5—6 точек). Готовят две серии среды с двумя значениями рН, например 7,1 и 7,8.
4. CaCl_2 — $4 \cdot 10^{-2}$ М раствор.
5. Реактивы для определения белка (с. 483).

Подготовку к проведению опыта целесообразно начать с приготовления 0,5 М KH_2PO_4 (рН 6,8).

Опыт 1. Полярографическая оценка зависимости скорости активного транспорта Ca^{2+} от рН (в диапазоне от 6,8 до 8,2) в присутствии 0,5 мМ KH_2PO_4 (среда 1). В полярографическую ячейку помещают 2 мл среды инкубации и погружают в нее электроды полярографа. После установления постоянного диффузионного тока в ячейке (около 1 мин) включают диаграммы на самописце КСП-4 и добавляют в ячейку 0,04—0,05 мл густой суспензии митохондрий (5—6 мг белка). Спустя 1 мин в ячейку добавляют раствор CaCl_2 в конечной концентрации $3\text{—}4 \cdot 10^{-4}$ М⁴ и регистрируют обратимую стимуляцию дыхания.

⁴ Эта концентрация достаточна для полного насыщения переносчика.

Строят график зависимости активированного ионами Ca^{2+} дыхания от рН среды инкубации и анализируют возможные ее причины с учетом влияния рН: а) на активность системы аккумуляции энергии (транспорт субстрата через мембрану, перенос электронов в дыхательной цепи, аппарат сопряжения); б) на активность переносчиков Ca^{2+} и неорганического фосфата в мембране; в) на концентрацию истинного субстрата переносчика неорганического фосфата в связи с изменением соотношения различных ионных форм фосфата⁵.

Опыт 2. При двух фиксированных значениях рН (например, 7,1 и 7,8) измеряют зависимость скорости активированного ионами Ca^{2+} дыхания от концентрации в среде фосфата и строят график зависимости в прямых и обратных величинах. Сопоставляя полученные данные (значения V_{max} и K_m для фосфата) с результатами опыта 1, отвечают на вопрос о том, что является причиной наблюдаемой в опыте 1 зависимости от величины рН.

Рассчитывают концентрации различных ионных форм фосфата при значениях рН, используемых в опыте, и представляют результаты расчетов в виде таблицы. Сравнивают количественно зависимость от рН изменения скорости дыхания в активном состоянии с изменениями концентраций H_3PO_4 , $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$, HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} и находят, какая из указанных форм фосфата является субстратом переносчика. Оценивают значения K_m для выбранной ионной формы фосфата.

ЛИТЕРАТУРА

Виноградов А. Д., Лейкин Ю. Н. Идентификация ионной формы фосфата, сопровождающей активное накопление Ca^{2+} митохондриями печени крысы // Биохимия. 1971. Т. 36. С. 1061.

9. РОЛЬ ТРАНСЛОКАЗНЫХ РЕАКЦИЙ В КИНЕТИКЕ СИНТЕЗА И ГИДРОЛИЗА АТФ В МИТОХОНДРИЯХ

Реакция синтеза (или гидролиза) АТФ в митохондриях осуществляется при участии трех ферментных систем: собственно АТФ-синтетазного комплекса, транслоказы адениннуклеотидов и переносчика неорганического фосфата. Последний катализирует реакцию электро-нейтрального переноса неорганического фосфата в митохондрии и из них. Активность переносчика ингибируется SH-модификаторами, такими как N-этилмалеимид и *n*-хлормеркурибензоат. Следствием этого является ингибирование SH-реагентами реакций окислительного фосфорилирования и гидролиза АТФ, катализируемых митохондриями.

В задачу настоящей работы входит изучение роли фосфатного переносчика в функционировании АТФ-гидролазной реакции, катализируемой митохондриями печени крысы. Гидролиз АТФ измеряют в настоящей задаче на рН-метре с регистрирующим самописцем по закислению среды в ходе реакции.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения митохондрий из печени крысы (с. 406).
2. Среда измерения активности, содержащая: 0,15 М сахарозу, 75 мМ KCl, 5 мМ фосфат калия, 2,5 мМ MgCl_2 , 1 мМ АТФ, рН 7,4.

⁵ Можно считать, что концентрация свободных ионов Ca^{2+} практически не зависит от рН в выбранном интервале.

3. 2,4-динитрофенол — 0,01 М раствор, рН 7,4.
4. Тритон X-100 — 20%-ный раствор.
5. N-этилмалеимид — 10 мМ раствор (готовят в день опыта).
6. Регистрирующий рН-метр с набором кювет и микропипеток объемом 0,02—0,2 мл.

Выделяют митохондрии из печени крысы. В кювету рН-метра наливают 4,5 мл среды измерения активности (п. 2) и погружают отмытый рН-электрод. Через 2—3 мин в кювету вносят 20—50 мкл суспензии митохондрий (2—4 мг) белка. Убеждаются в том, что нативные митохондрии не катализируют реакцию гидролиза АТФ в отсутствие разобщителя. Через 1 мин после внесения митохондрий в кювету добавляют динитрофенол до конечной концентрации, равной 0,1 мМ. Внесение разобщителя приводит к снятию трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода и активации реакции гидролиза АТФ. Измерение повторяют, в кювету после добавления митохондрий вместо динитрофенола вносят детергент тритон X-100 до конечной концентрации 0,1%. Наблюдают, как и в случае динитрофенола, стимуляцию реакции. Выбирают концентрацию тритона (в интервале от 0,02 до 2%) для проявления максимальной ферментативной активности.

К 200 мкл густой суспензии митохондрий (~50 мг/мл), стоящей на льду, добавляют N-этилмалеимид до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубируют 30 мин. Измеряют АТФазную активность в суспензии, как описано выше. Наблюдают инактивацию ферментативной реакции, измеренной в присутствии динитрофенола, вызванную модификацией фосфатного переносчика. Добавление по ходу реакции тритона X-100 в оптимальной концентрации, определенной ранее, приводит к снятию барьера проницаемости для фосфата и восстановлению активности.

Примечания. 1. При измерении активности на рН-метре необходимо после завершения каждого измерения определять цену деления шкалы на самописце. Для этого в кювету вносят небольшой объем (0,02—0,05 мл) титрованной щелочи (50 мМ) и фиксируют ответ рН-метра. 2. Все активности выражают в микромолях гидролизованного АТФ за 1 мин в расчете на 1 мг белка митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

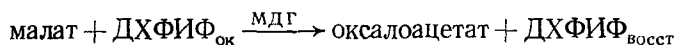
1. Fonyo A. SH-Reagent as tools in the study of anion transport//J. Bioenerg. and Biomembranes. 1978. Vol. 10. P. 171.
2. Wohlrab H. Purification of a reconstitutively active mitochondrial phosphate transport protein//J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 8170.
3. LaNoue K. F., Schoolwerth A. C. Metabolite transport in mitochondria//Ann. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 171.
4. Agula H., Link T. A., Klingenberg M. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family//FEBS Lett. 1987. Vol. 212. P. 1.

10. РОЛЬ ТРАНСЛОКАЗНЫХ РЕАКЦИЙ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЦТК

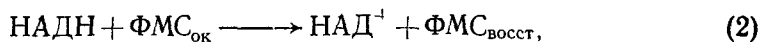
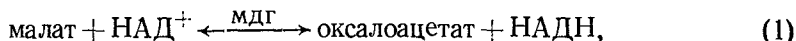
Протекающие в митохондриях метаболические процессы сопровождаются непрерывным обменом интермедиатов между матриксом и окружающей средой с помощью ферментов-переносчиков, локализованных во внутренней мембране митохондрий. Вклад транслоказных реакций в регуляцию путей метаболических превращений можно оценить по количественному определению промежуточных продуктов обмена.

В настоящей задаче предлагается изучить пути превращения экзогенного сукцината при его окислении в митохондриях печени крысы в

различных метаболических состояниях. Одним из продуктов обмена сукцината в митохондриях является малат. Количественное определение его основано на измерении продуктов ферментативной реакции окисления малата искусственными акцепторами электронов. Суммарная реакция окисления малата акцептором — ДХФИФ, катализируемая малатдегидрогеназой (МДГ — КФ 1.1.1.37), выглядит так:



протекает в несколько стадий:



где $\text{ФМС}_{\text{ок}}$ и $\text{ФМС}_{\text{восст}}$ — окисленная и восстановленная форма феназинметосульфата; $\text{ДХФИФ}_{\text{ок}}$ и $\text{ДХФИФ}_{\text{восст}}$ — дихлорфенолиндофенол в окисленном и восстановленном состояниях.

Равновесие реакции окисления малата окисленным динуклеотидом (реакция 1) сильно сдвинуто влево. Ее протекание становится возможным в присутствии искусственных акцепторов электронов ФМС и ДХФИФ , быстро и практически необратимо окисляющих НАДН в неэнзиматических реакциях (2) и (3). Восстановление ДХФИФ приводит к спектральным изменениям, что позволяет использовать спектрофотометрический подход для регистрации реакции. Измерение концентрации малата описанным методом следует проводить в присутствии аспартат-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), катализирующей непрерывное удаление оксалоацетата — сильного ингибитора малатдегидрогеназы.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения митохондрий из печени крысы (с. 406).
2. Среда инкубации, содержащая 0,15 М сахарозу: 75 мМ KCl ; 5 мМ фосфат калия (рН 7,4); 2,5 мМ MgCl_2 и 5 мкМ ротенона.
3. Сукцинат калия — 0,5 М раствор, рН 7,4.
4. 2,4-динитрофенол — 10 мМ раствор, рН 7,4.
5. HClO_4 — 2 М раствор — 50 мл.
6. HCl и KOH — 1 М растворы — 50 мл.
7. Среда для измерения концентрации малата, содержащая: 20 мМ фосфат калия (рН 7,4), 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ НАД^+ , 10 мМ глутамат калия — 100 мл.
8. Феназинметосульфат — 0,1 М раствор; готовить в день опыта и хранить защищенным от света — 1 мл.
9. Дихлорфенолиндофенол — 5 мМ раствор — 5 мл.
10. Малатдегидрогеназа (~ 10 мг/мл), отдиализованная против 20 мМ калий фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,2 мМ ЭДТА — 2 мл.
11. Аспартат-аминотрансфераза (~ 10 мг/мл), отдиализованная против того же буфера, что и малатдегидрогеназа — 2 мл.
12. L-малат — 1 мМ раствор, рН 7,4.
13. Полярограф с набором кювет и микропипеток объемом 0,02—0,1 мл.
14. Спектрофотометр с набором кювет.

Выделяют митохондрии из печени крысы. В кювету полярографа помещают 2 мл среды инкубации (п. 2) и погружают в электроды. Через 1—2 мин в кювету вносят 100 мкл густой (~ 100 мг/мл) суспензии митохондрий, добавляют субстрат окисления — сукцинат — до конечной концентрации 5 мМ. Регистрируют постоянную скорость дыхания. После окончания реакции (полного восстановления кислорода, растворенного в среде) из кюветы быстро отбирают 1 мл прореагировавшей суспензии митохондрий и добавляют в стеклянную пробирку, содержащую 1 мл 2 М HClO_4 . Денатурированные белки осаждают центрифугированием на лабораторной центрифуге. Один миллилитр прозрачного супернатанта, содержащего продукты окисления сукцината, переносят в чистую центрифужную пробирку, добавляют равный объем 1 М раствора КОН, при необходимости доводят значение pH раствора до нейтрального добавлением нескольких капель 1 М HCl или 1 М КОН (значение pH контролируют с помощью индикаторной бумаги). Пробирку ставят на лед на 10—15 мин, выпавший осадок перхлората калия отсепаровывают центрифугированием, а супернатант сливают в чистую пробирку и хранят в холодильнике. Повторяют измерение сукцинатоксидазной активности на полярографе, как указано ранее. После внесения в кювету субстрата дыхания добавляют динитрофенол до конечной концентрации, равной 100 мкМ. После окончания реакции проводят осаждение митохондрий HClO_4 , повторяя описанные выше стадии. Рекомендуется повторить каждое измерение (как в присутствии, так и без динитрофенола) 2—3 раза.

Для определения концентрации образовавшегося малата в спектрофотометрическую кювету вносят 3 мл среды для измерения концентрации малата, добавляют 50 мкМ дихлорфенолиндофенол, 1 мМ ферразинметосульфат, малатдегидрогеназу — 50 мкг/мл и аспартатаминотрансферазу — 50 мкг/мл. Определяют значение оптической плотности раствора при длине волны 600 нм, соответствующей максимуму поглощения окисленной формы ДХФИФ ($\epsilon_{\text{мм}}^{600 \text{ нм}} = 20$). В кювету добавляют 50—100 мкл раствора малата и фиксируют уменьшение оптической плотности, связанное с восстановлением дихлорфенолиндофенола. Рекомендуется определить указанным методом концентрацию приготовленного по навеске раствора L-малата. Рассчитывают концентрацию образующегося в результате реакции окисления янтарной кислоты малата и определяют стехиометрическое соотношение окисленного сукцината к образованному малату в отсутствие и в присутствии разбавителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meijer A. J., Van Dam K. The metabolic significance of anion transport in mitochondria//*Biochim. Biophys. Acta*. 1974. Vol. 346. P. 213.
2. Palmieri F., Prezioso G., Quagliariello E. Kinetic study of the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria//*Europ. J. Biochem.* 1971. Vol. 22. P. 66.
3. La Noue K. F., Schoolwerth A. C. Metabolite transport in mitochondria//*Ann. Rev. Biochem.* 1979. Vol. 48. P. 871.

VI. РЕАКЦИИ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В МИТОХОНДРИЯХ

1. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ СОПРЯЖЕННОСТИ ПРЕПАРАТА МИТОХОНДРИЙ

Интактные митохондрии, инкубируемые в среде, содержащей субстрат окисления и кислород, характеризуются низкой скоростью дыха-

ния. Она может быть увеличена в несколько раз добавлением акцепторов энергии, аккумулирующей в дыхательной цепи (АДФ + Φ_n , АДФ + Φ_n + глюкоза + гексокиназа). Активация дыхания акцепторами энергии наблюдается только в том случае, если перенос электронов по дыхательной цепи прочно сопряжен с фосфорилированием. При разрушении митохондрий, при добавлении детергентов или разобщителей степень активации дыхания добавленным АДФ уменьшается или исчезает, что связано с нарушением сопряжения. Стимуляция дыхания изолированных митохондрий при добавлении АДФ в присутствии субстрата окисления, фосфата и кислорода носит название «дыхательного контроля» (ДК). Количественная оценка этого явления позволяет получить информацию о степени сопряженности препарата митохондрий, выделенного из различных органов и тканей.

На рис. 58 приведена типичная кривая потребления кислорода митохондриями. Добавление к суспензии субстрата окисления (S) приводит к медленному потреблению кислорода — со скоростью V_4^S . Вне-

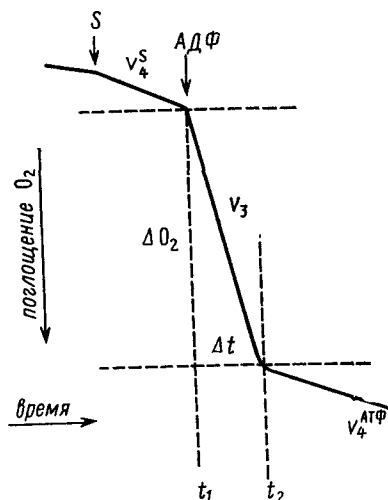


Рис. 58. Полярографическая регистрация дыхания митохондрий

сение в реакционную смесь АДФ в концентрации $[x]$ в момент времени t_1 вызывает немедленную активацию дыхания (скорость потребления кислорода V_3^6). К моменту времени t_2 добавленная АДФ фосфорилируется, полностью превращаясь в АТФ, и дыхание вновь тормозится до уровня V_4^{ATP} . В этих условиях потребление кислорода может быть вновь активировано добавлением АДФ или глюкозы с гексокиназой.

Отношение V_3/V_4^{ATP} называют коэффициентом дыхательного контроля. Его величина меняется от 1 при полном отсутствии дыхательного контроля до 8—10 в случае прочно сопряженного препарата.

Если известны концентрации добавленной АДФ и количество кислорода, потребленное в состоянии 3, легко рассчитать коэффициент

⁶ Исторически сложилось так, что состояние, характерное для митохондрий, инкубируемых с субстратом в аэробных условиях, называют «состоянием 4»; состояние с субстратом и АДФ в аэробных условиях — «состоянием 3». Эти обозначения широко используются в литературе. В соответствии с этим индексы при значении скоростей обозначены как 4 и 3.

фосфорилирования АДФ/О. Очевидно, что численные значения этого коэффициента должны соответствовать коэффициенту Р/О, характеризующему термодинамическую эффективность окисления различных субстратов. Экспериментально определяемые коэффициенты фосфорилирования обычно меньше или равны: 3 — для окисления малата, 2 — для сукцината и 1 — для аскорбата.

Величина $\text{АДФ}/\Delta t$ (М/мин·мг белка) соответствует скорости фосфорилирования. Отношение скоростей $V_4^S/V_4^{\text{АТФ}}$ характеризует активность АТФ-гидролазных реакций митохондрий, регенерирующих АДФ после его фосфорилирования.

Таким образом, имея экспериментально полученные полярограммы для митохондрий, можно провести весьма полную количественную оценку полученного препарата.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий (с. 404).
2. Среда инкубации митохондрий (готовят из концентрированных основных растворов):
 - а) печени — 0,15 М сахараза; 0,075 М КСl, 0,005 М фосфат калия, 0,0025 МgCl₂, рН 7,4.
 - б) сердца — 0,3 М сахараза, 0,01 М КСl, 0,005 М фосфат калия, 0,001 М ЭДТА, рН 7,4.
 - в) скелетной мышцы — 0,1 М КСl, 0,02 М фосфат калия, 0,005 МgCl₂, рН 7,4.
3. Сукцинат калия — 1 М раствор, рН 7,4. Для митохондрий скелетной мышцы при использовании сукцината в среду инкубации добавляют ротенон в концентрации $2,5 \cdot 10^{-7}$ М.
4. Смесь: глутамат калия (0,5 М) и малат калия (0,5 М).
5. Аскорбиновая кислота — 0,5 М раствор, рН 7,4 (готовят непосредственно перед употреблением).
6. Тетраметил-*п*-фенилендиамин (ТМФД) — 0,01 М раствор.
7. АДФ — 0,02 М раствор, рН 7,4.
8. 2,4-динитрофенол — 0,01 М раствор, рН 7,4.
9. Реактивы для определения белка (с. 483).

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

Выделяют митохондрии (с. 404). В кювету полярографа помещают 2 мл среды инкубации, погружают электроды и устанавливают положение пера самописца в исходное положение шкалы. Реакцию начинают добавлением 0,04—0,06 мл густой суспензии митохондрий (5—7 г белка). Через 30—40 с в кювету добавляют субстрат окисления (конечные концентрации для сукцината — 10 мМ, для глутамата и малата — по 5 мМ, для аскорбата — 5 мМ, для ТМФД — 100 мкМ). Регистрируют постоянную скорость дыхания и через 40—60 с добавляют 200 мкМ АДФ. После последовательного изменения скоростей дыхания (переход $V_4^S \rightarrow V_3 \rightarrow V_4^{\text{АТФ}}$) через 1—2 мин добавляют 100 мкМ 2,4-динитрофенол. Регистрируют убыль кислорода в кювете до наступления анаэробноза. Рассчитывают скорости потребления кислорода в различных состояниях, коэффициенты дыхательного контроля и фосфорилирования, скорость фосфорилирования, отношение скоростей $V_4^S/V_4^{\text{АТФ}}$.

Результаты оформляют в виде таблицы.

1. Chance B., Williams G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilisation//J. Biol. Chem. 1955 Vol. 217. P 383.

2. ИЗМЕРЕНИЕ СТЕПЕНИ СОПРЯЖЕННОСТИ И СКОРОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ. ЗАВИСИМОСТЬ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА И РОЛЬ ИОНОВ Ca^{2+}

Изучение большого числа протекающих в митохондриях процессов может быть успешно проведено как с изолированными органеллами в качестве источника фермента, так и с высокоочищенными препаратами соответствующих митохондриальных ферментов. Однако второй подход практически неприемлем для изучения реакций, непосредственно сопряженных с функционированием системы трансформации энергии в митохондриях. В первую очередь это относится к процессу окислительного фосфорилирования, который с высокой эффективностью протекает и может быть изучен либо в изолированных (интактных) митохондриях, либо в специальном образом полученных препаратах субмитохондриальных частиц. В этом случае также важно убедиться в том, что скорость изучаемой реакции линейно зависит от концентрации катализатора (от концентрации общего белка митохондрий или субмитохондриальных частиц). Измерение скорости окислительного фосфорилирования и термодинамической эффективности (отношение АДФ/О) традиционно проводится и предшествует изучению любых митохондриальных функций.

В настоящей работе предлагается изучить зависимость скорости окислительного фосфорилирования и степени сопряженности митохондрий печени крысы от концентрации белка и проанализировать причины ее отклонения от линейности.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Среда инкубации, содержащая 0,15 М сахарозу, 75 мМ КСl, 2,5 мМ MgCl_2 , 5 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4 — 50 мл.
3. Сукцинат калия 1 М раствор, pH 7,4.
4. 2,4-динитрофенол — 10^{-2} М раствор, pH 7,4.
5. АДФ — $2 \cdot 10^{-2}$ М раствор, pH 7,4.
6. ЭГТА — 10^{-2} М раствор, pH 7,4.
7. Ротенон — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этаноле.
8. Ионофор А23187 — 10^{-3} М раствор в перегнанном этаноле.
9. CaCl_2 — $2 \cdot 10^{-2}$ М раствор, готовят разведением титрованного раствора CaCl_2 (см. с. 484).
10. НСl и КОН — 10^{-2} М растворы, готовят разведением титрованных растворов НСl и КОН.
11. Регистрирующий pH-метр или полярограф с набором кювет и микропипеток (от 10 до 100 мкл).

В первой серии экспериментов подбирают концентрацию разбавителя (ДНФ), вызывающую максимальную стимуляцию дыхания. Для этого промытые и подсушенные электроды полярографа погружают в кювету с 2 мл среды (см. выше), содержащую дополнительно 5 мМ сукцинат и 5 мкМ ротенон. Включают самописец и после установления постоянного по величине тока начинают реакцию добавлением мито-

дыхание регистрируют 2—3 мин и, убедившись в том, что скорость процесса не изменяется во времени, в кювету добавляют 10 мкМ ДНФ. Убеждаются в активации дыхания, которое регистрируют до истощения кислорода в пробе. Ставят аналогичные пробы с возрастающими концентрациями ДНФ (20, 30, 50 и 100 мкМ). Строят графическую зависимость скорости дыхания от концентрации ДНФ и выбирают насыщающую концентрацию разбавителя.

В следующей серии опытов реакцию начинают добавлением различных количеств митохондрий (от 0,5 до 5 мг белка в пробе) и после добавления выбранной концентрации ДНФ каждый раз регистрируют дыхание до истощения кислорода в среде.

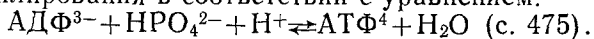
Проводят аналогичную серию опытов с различными концентрациями белка митохондрий, добавляя вместо разбавителя 200 мкМ АДФ. После превращения всей добавленной АДФ в АТФ и выхода в контролируемое состояние пробы заканчивают (анаэробноз) добавлением АДФ или ДНФ. Полученные результаты представляют в виде графической зависимости скорости разобщенного дыхания (+ДНФ), скорости дыхания в состоянии 3 (+АДФ), скорости фосфорилирования, отношения АДФ/О и ДК от концентрации белка митохондрий в пробе.

Проводят три серии экспериментов по измерению окислительного фосфорилирования при различных концентрациях белка митохондрий в среде, содержащей дополнительно 100 мкМ ЭГТА (серия 1), 100 мкМ ЭГТА и 5 мкМ А23187 (серия 2) и 10^{-7} М рутениевый красный (серия 3). Параметры окислительного фосфорилирования рассчитывают и сравнивают с результатами проведенных ранее опытов.

Проводят спектрофотометрические измерения концентрации примесного (загрязнение реактивов) Ca^{2+} в среде инкубации с подходящим металлохромным индикатором. Анализируют причины отклонения от линейности зависимости скорости исследуемого процесса от концентрации белка митохондрий.

В качестве дополнительного задания можно предложить следующий опыт. Измеряют параметры окислительного фосфорилирования с использованием небольшого количества митохондрий в пробе (около 0,5 мг белка). Оценивают концентрацию примесного Ca^{2+} в среде инкубации. Измерения с большими концентрациями белка проводят в среде, дополненной пропорционально возрастающей концентрацией Ca^{2+} (добавляют порции заранее приготовленного титрованного раствора CaCl_2).

Настоящая работа может проводиться с помощью рН-метрической регистрации защелачивания среды в процессе окислительного фосфорилирования в соответствии с уравнением:



В этом случае для калибровки шкалы должны быть использованы заранее приготовленные титрованные растворы 10^{-2} М HCl или KOH .

Примечание. При выборе концентрации ЭГТА в этих опытах студент должен руководствоваться значением K_d комплекса $\text{Ca} \cdot \text{ЭГТА}$ в используемых условиях, сродством Ca^{2+} -транспортирующей системы митохондрий для Ca^{2+} и содержанием эндогенного и примесного Ca^{2+} в системе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chance B., Williams G. R. Respiratory enzyme in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilisation//J. Biol. Chem. 1955. Vol. 217. P. 383.
2. Лейкин Ю. Н., Виноградов А. Д. Взаимоотношение процессов окислительного фосфорилирования и транспорта ионов Ca^{2+} в митохондриях//Укр. биохим. журн. 1971. Т. 43, № 1. С. 88.

3. Reinhart P. N., Van De Pol E., Taylor W. M. et al. An assesment of the calcium content of rat liver mitochondria in vivo//Biochem. J. 1984. Vol. 218. P. 418.
4. Reed P. W., Lardy H. A. A23187: a divalent cation ionophore//J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 6970.
5. Nicholls D. G The regulation of extramitochondrial calcium ion concentration by rat liver mitochondria//Biochem. J. 1978. Vol. 176. P. 463.

3. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ С РАЗЛИЧНЫМИ СУБСТРАТАМИ

Современные представления о пунктах сопряжения реакций переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий с аккумуляцией энергии могут быть суммированы в виде простой схемы (рис. 59). Из нее видно, что максимальное теоретически возможное количество молекул АТФ, образующихся при переносе пары электронов от субстра-

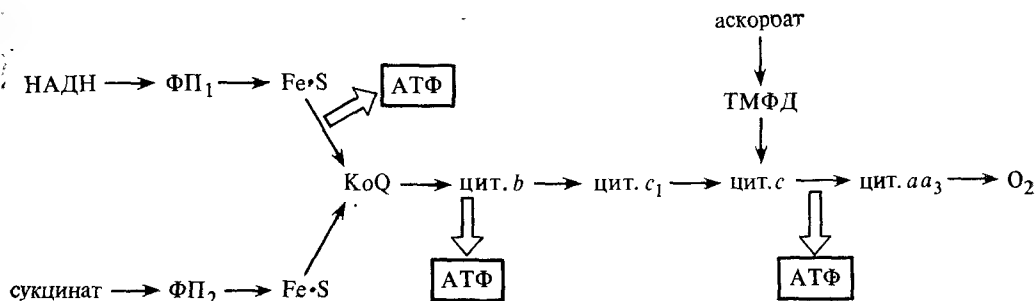


Рис. 59. Локализация пунктов сопряжения в дыхательной цепи

та окисления к кислороду, зависит от природы окисляемого субстрата. Для окисления НАДН это число равно 3, для сукцината — 2, а для окисления восстановленного цитохрома с — 1. В случае окисления α -кетоглутаровой кислоты обычно наблюдается образование четырех молекул АТФ. Последнее обстоятельство связано с существованием субстратного фосфорилирования, не требующего переноса электронов по дыхательной цепи. Величиной, характеризующей эффективность окислительного фосфорилирования, служит коэффициент фосфорилирования Р/О, т. е. отношение числа г-атомов эстерифицированного неорганического фосфата к числу г-атомов потребленного кислорода.

Определив потребление митохондриями неорганического фосфата и кислорода в аппарате Варбурга (с. 10), рассчитывают коэффициент фосфорилирования. Так как для достоверного определения кислорода и неорганического фосфата необходима довольно продолжительная инкубация митохондрий, в реакционную смесь обычно вносят АДФ-регенерирующую систему (чаще всего для этой цели используют гексокиназу с глюкозой). Это удобно также потому, что гексокиназа успешно конкурирует с митохондриальными АТФ-азными реакциями, которые могут сильно искажать результаты опытов, гидролизуя образующийся в ходе фосфорилирования АТФ.

Задача настоящей работы состоит в определении коэффициента фосфорилирования при окислении митохондриями различных субстратов.

1. Реактивы для выделения митохондрий (с. 405).
2. Раствор солевой смеси: 0,066 М фосфат калия (рН 7,4), 0,33 М КСl, 0,016 М MgCl₂ (концентрацию раствора MgCl₂-определяют титрованием ЭДТА с эриохромом черным Т — с. 484).
3. Глюкоза — 0,5 М раствор.
4. Гексокиназа кристаллическая.
5. Сукцинат калия — 0,1 М раствор, рН 7,4.
6. α-Кетоглутарат калия — 0,1 М раствор, рН 7,4.
7. Аскорбат калия — 0,05 М раствор (рН 7,4), содержащий тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД) — 0,005 М раствор.
8. АТФ — 0,0075 М раствор, рН 7,4.
9. Трихлоруксусная кислота — 5%-ный раствор.
10. КОН — 10%-ный раствор.
11. Реактивы для определения фосфата (с. 34).

Предварительно определяют константы сосудов (с. 12). В день опыта, прежде чем приступить к выделению митохондрий, подготавливают аппарат Варбурга к работе. Для этого заполняют дополнительный резервуар сосудиков нарезанной фильтровальной бумагой и смачивают ее в 0,3 мл 10%-ного раствора КОН для поглощения СО₂. Заполняют основное пространство сосудиковой средой инкубации по схеме:

№ сосудика	Солевая смесь, мл	Раствор субстрата, мл	Раствор АТФ, мл
1—3	0,6	0,4 (сукцинат)	0,4
4—6	0,6	0,4 (кетоглутарат)	0,4
7—9	0,6	0,4 (аскорбат)	0,4

Пробы 3, 6, 9 служат контролем и их не инкубируют в аппарате Варбурга. Доводят температуру в термостате до 26°С. Готовят раствор гексокиназы на 0,5 М глюкозе, исходя из расчета 0,5—1 мг гексокиназы на пробу (необходимое количество гексокиназы находят в предварительных опытах). Выделяют митохондрии из исследуемой ткани (с. 403). Во все сосудики разливают по 0,2 мл раствора гексокиназы в глюкозе и по 0,4 мл суспензии митохондрий, быстро притирают сосудики к манометрам и помещают их в термостат аппарата Варбурга. Включают качающий механизм и через 10 мин, в течение которых происходит выравнивание температуры, подводят жидкость в обоих коленах манометра до одного уровня (150—250), закрывают краны и приступают к определению поглощения кислорода.

Снятие показаний манометра и расчет количества потребленного кислорода см. на с. 18. Показания манометров снимают через каждые 10 мин, при общем времени инкубации 30 мин. После окончания срока инкубации реакцию останавливают добавлением во все сосудики по 2 мл холодной 5%-ной трихлоруксусной кислоты. В контрольные пробы кислоту добавляют перед разливанием суспензии митохондрий. Все пробы фильтруют и из фильтрата отбирают равные объемы на определение неорганического фосфата. Количество эстерифицированного фосфата определяют по разности между опытными и контрольными пробами. Рассчитывают коэффициент фосфорилирования Р/О. Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

1. Мешкова Н. П., Северин С. Е. Практикум по биохимии животных. М., 1950.
2. Ленинджер А. Митохондрия. М., 1968.
3. Скулачев В. П. Соотношения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1961.

4. ВЛИЯНИЕ РАЗОБЩИТЕЛЕЙ НА ПРОЦЕССЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В МИТОХОНДРИЯХ

Энергия, освобождающаяся в процессе переноса электронов в митохондриях, трансформируется в электрохимический градиент ионов H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$, протондвижущая сила) и расходуется для протекания различных эндергонических реакций.

К числу наиболее хорошо охарактеризованных эндергонических реакций митохондрий относятся наряду с окислительным фосфорилированием АДФ восстановление НАД⁺ сукцинатом, трансгидрогеназная реакция и перенос ионов Ca^{2+} против концентрационного градиента. Изучение кинетических взаимоотношений таких реакций при их одновременном протекании важно не только для понимания механизмов регуляции метаболизма митохондрий в целом, но и для выяснения механизмов, лежащих в основе любого из путей трансформации энергии в митохондриях.

При одновременном добавлении АДФ и Ca^{2+} в аэробную суспензию энергизованных митохондрий окислительное фосфорилирование не происходит до тех пор, пока весь добавленный Ca^{2+} не поглотится внутрь митохондрий. Это свидетельствует об отсутствии простой конкуренции между процессами и не может быть удовлетворительно объяснено различиями кинетических параметров исследуемых эндергонических реакций. Ясное понимание таких взаимоотношений может быть получено при анализе энергетического состояния митохондрий (величины трансмембранного потенциала) при их взаимодействии с АДФ и ионами Ca^{2+} .

В работе предлагается сравнить действие разобщителей на процессы окислительного фосфорилирования и активного транспорта Ca^{2+} в митохондриях печени крысы. Так как протекание обеих эндергонических реакций сопряжено с поглощением (синтез АТФ) или освобождением (транспорт Ca^{2+}) стехиометрических количеств ионов H^+ , следует воспользоваться установкой для непрерывной регистрации рН стеклянным H^+ -чувствительным электродом (с. 474). Изменения трансмембранного потенциала прослеживают по распределению K^+ (в присутствии валиномицина в бескалиевой среде — с. 442) с помощью K^+ -чувствительного электрода или по абсорбции проникающих синтетических катионов (например, сафранин, оксанол и др.) с помощью двухволновой спектрофотометрии.

Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Среда инкубации, содержащая 0,15 М сахарозу, 75 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ KH_2PO_4 , рН 7,4 — 50 мл.
3. Сукцинат калия — 1 М раствор, рН 7,4.
4. АДФ — $2 \cdot 10^{-2}$ М раствор, рН 7,4.
5. 2,4-динитрофенол — 10^{-2} М раствор, рН 7,4.
6. $CaCl_2$ — $5 \cdot 10^{-2}$, $4 \cdot 10^{-2}$, $3 \cdot 10^{-2}$, $2 \cdot 10^{-2}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ М растворы, готовят разведением титрованного раствора $CaCl_2$ (с. 484).

1. Ротенон — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этаноле.
8. HCl и КОН — 10^{-2} М растворы, готовят разведением титрованных растворов HCl и КОН.
9. Регистрирующий рН-метр и полярограф с набором кювет и микропипеток. Объем 10—20 мкл (6—8 штук) и 40—60 мкл (1 шт.).

В первой части работы изучают влияние разобшителя на сукцинатоксидазную активность митохондрий. В кювету полярографа с 2 мл среды с 5 мкМ ротеноном после погружения в нее электродов и включения самописца добавляют 40—60 мкл суспензии митохондрий (4—5 мг белка). Через 1—2 мин в кювету добавляют 5 мМ сукцинат и регистрируют дыхание митохондрий с постоянной скоростью на протяжении 1—2 мин. Добавляют 5 мкМ ДНФ и регистрируют дыхание до полного исчерпания кислорода в среде. В следующих пробах последовательно увеличивают концентрацию ДНФ до тех пор, пока дальнейшее увеличение ее не будет вызывать увеличения скорости дыхания. В прочносопряженных митохондриях насыщение сукцинатоксидазной активности обычно достигается в присутствии 50—100 мкМ ДНФ. Строят графическую зависимость скорости окисления сукцината в митохондриях от концентрации ДНФ (5—6 экспериментальных точек).

Для проведения следующей части работы на полярографе подбирают максимальную концентрацию Ca^{2+} , добавление которого к митохондриям в среде с сукцинатом вызывает обратимую активацию дыхания. Для прочносопряженных митохондрий печени крысы (4—5 мг белка в пробе) это составляет около 200—400 мкМ Ca^{2+} . Дальнейшие измерения проводят на регистрирующем рН-метре. В ячейку рН-метра со средой инкубации и погруженными электродами добавляют последовательно митохондрии, сукцинат и выбранную концентрацию Ca^{2+} . Регистрируют быстрое освобождение ионов H^{+} (закисление среды) из матрикса в ответ на добавление Ca^{2+} . После аккумуляции всего добавленного Ca^{2+} изменения рН среды прекратятся и на фоне нового стационарного значения рН в суспензии добавляют 1—2 раза одинаковое количество титрованной HCl или КОН для калибровки шкалы (конечная концентрация HCl или КОН в используемых условиях должна составлять около 10^{-4} М). Проводят серию аналогичных проб, содержащих увеличивающиеся концентрации ДНФ, и каждый раз регистрируют скорость закисления среды в процессе активного транспорта Ca^{2+} . Для полного торможения транспорта Ca^{2+} в митохондриях диапазон концентрации ДНФ должен быть значительно (в 2—3 раза) расширен по сравнению с опытами по измерению сукцинатоксидазной активности. Делают 5—6 измерений и строят графическую зависимость скорости транспорта Ca^{2+} от концентрации разобшителя (5—6 экспериментальных точек).

Аналогичным образом измеряют окислительное фосфорилирование по защелачиванию среды в соответствии с уравнением: $\text{АДФ}^{3-} + \text{НРО}_4^{2-} + \text{H}^{+} \rightleftharpoons \text{АТФ}^{4-} + \text{H}_2\text{O}$. Готовят серию проб с увеличивающимися концентрациями разобшителя и убеждаются в постепенном (от пробы к пробе) снижении скорости окислительного фосфорилирования. В этом случае диапазон концентраций разобшителя будет совпадать с диапазоном, найденным ранее при титровании сукцинатоксидазной активности. Каждое измерение должно заканчиваться добавлением титрованной HCl или КОН для калибровки шкалы. Строят графически зависимость скорости окислительного фосфорилирования от концентрации ДНФ. Анализируют результаты проведенных полярографических и рН-метрических измерений.

Для более углубленного самостоятельного изучения предмета предлагается выполнить следующие работы.

1. Провести измерения трансмембранного потенциала при добавлении в суспензию энергизованных митохондрий увеличивающихся концентраций ДНФ, АДФ и Ca^{2+} . Результаты такого титрования сопоставить с результатами основной части работы.

2. Провести отдельные рН-метрические измерения окислительного фосфорилирования, активного транспорта Ca^{2+} и транспорта Ca^{2+} на фоне фосфорилирования АДФ в митохондриях. Рассчитать полученные данные и убедиться в том, что окислительное фосфорилирование не влияет на скорость активного транспорта Ca^{2+} , а добавление Ca^{2+} полностью блокирует окислительное фосфорилирование.

3. Провести кинетический анализ ингибирующего действия ДНФ на процессы активного транспорта Ca^{2+} и окислительного фосфорилирования АДФ в митохондриях. Измерения следует провести отдельно для 3 различных концентраций Ca^{2+} и АДФ. Полученные результаты проанализировать в координатах Диксона (v_0/v_i от концентрации ДНФ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Rossi C. S., Lehninger A. L. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca^{2+} and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria//J. Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 3971.
2. Лейкин Ю. Н., Барская Н. В., Виноградов А. Д. Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. М., 1977. С. 100.
3. Robertson S. P., Potter G. D., Rouslin W. The Ca^{2+} and Mg^{2+} dependence of Ca^{2+} uptake and respiratory function of porcine heart mitochondria. Probable physiological significance during the cardiac contraction—relaxation cycle//J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 1743.
4. Николс Д. Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. М., 1985.

5. ИЗМЕРЕНИЕ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИИ

Перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий приводит к аккумуляции энергии окислительно-восстановительных реакций в виде АТФ. Протекание эндергонической реакции синтеза АТФ из АДФ и P_i (~ 10 ккал/мол) возможно за счет экзергонической реакции окисления НАДН или сукцината кислородом. Механизмом, обеспечивающим сопряжение этих двух реакций, является АТФ-синтетазный комплекс, способный в определенных условиях катализировать гидролитический распад АТФ. Последняя реакция (АТФазная активность) служит удобным объектом для изучения механизма окислительного фосфорилирования. Схема, иллюстрирующая процесс образования и распада АТФ в митохондриях, приведена на рис. 60.

Химический механизм сопряжения переноса электронов с образованием АТФ неизвестен. Наибольшее признание в последние годы получила гипотеза П. Митчелла об электрохимическом (хемиосмотическом) сопряжении окислительных реакций в дыхательной цепи с синтезом АТФ, катализируемым АТФ-синтетазным комплексом. Согласно этой гипотезе вне- и внутримитохондриальные пространства (левая и правая часть рисунка соответственно) разделены мембраной M , непроницаемой для ионов водорода — H^+ . Дыхательная цепь организована в мембране таким образом, что окисление субстрата (SH_2) кислородом приводит к разделению зарядов (группа реакций — I). Энергия окисления запасается в виде электрохимического потенциала H^+

по обе стороны мембраны. Это свободная энергия складывается из собственно электрической компоненты (разделение зарядов: H^+ — слева, OH^- — справа) и концентрационного градиента (разница pH внутри и вне митохондрий). АТФ-синтетазный комплекс (на схеме

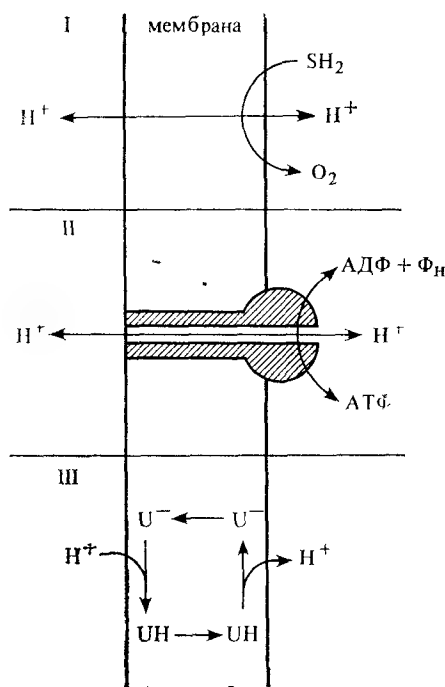


Рис. 60. Схематическое изображение процессов синтеза и гидролиза АТФ в митохондриях

заштриховано) обеспечивает экзергоническое перемещение H^+ слева направо и образование за счет освобождающейся энергии АТФ из АДФ и F_n (группа реакций II). Неспецифический перенос протонов через мембрану слева направо анионом U^- освобождает энергию в виде тепла и разобщает окисление и фосфорилирование. Гидролиз АТФ приводит к переносу двух H^+ справа налево и возникновению электрохимического потенциала. Таким образом, АТФазная активность интактных митохондрий мала до тех пор, пока отсутствуют пути переноса H^+ слева направо. Добавление разобщителей снимает электрохимический потенциал H^+ и резко стимулирует АТФазную активность (комбинация реакций II и III). Функционирование АТФ-синтетазного (или АТФ-азного) комплекса требует присутствия ионов Mg^{2+} . В интактных митохондриях их концентрация обычно достаточно велика, чтобы обеспечить высокую скорость гидролиза АТФ в присутствии разобщителя. Разрушение митохондриальной мембраны (детергентами, ультразвуком, нагреванием) обычно приводит к появлению неспецифической проводимости мембраны для H^+ или полному снятию барьера M . В этих случаях АТФазная активность сильно активируется и требует для своего проявления добавления ионов Mg^{2+} .

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий (с. 403).
2. KCl — 0,1 М раствор в 0,05 М трис-HCl (pH 7,4), готовят в день опыта.
3. KCl — 0,3 М раствор в 0,015 М трис-HCl (pH 7,4), готовят в день опыта.
4. АТФ — 0,025 М раствор, pH 7,4.
5. MgCl₂ — растворы следующих концентраций: 0,005; 0,010; 0,025; 0,050; 0,075 и 0,100 М, готовят разведением 0,1 М раствора MgCl₂, устанавливая концентрацию титрованием с эриохромом черным Т (с. 484).
6. 2,4-динитрофенол — $4 \cdot 10^{-4}$ М раствор, pH 7,4.
7. ЭДТА — 0,1 М раствор, pH 7,4.
8. Хлорная кислота — 1 М раствор.
9. Бычий сывороточный альбумин (для митохондрий скелетных мышц — 1%-ный раствор).
10. Реактивы для определения фосфата (с. 34).

Перед выделением митохондрий в 11 колбочках составляют среды инкубации следующего состава, мл:

№ проб	Раствор № 3, мл	MgCl ₂ , М (по 0,2 мл раствора)	ДНФ	ЭДТА	Альбумин* 1%-ный раствор	H ₂ O**, мл
1	0,6	0,005	—	—	0,2	0,4
2	0,6	0,010	—	—	0,2	0,4
3	0,6	0,025	—	—	0,2	0,4
4	0,6	0,050	—	—	0,2	0,4
5	0,6	0,075	—	—	0,2	0,4
6	0,6	0,100	—	—	0,2	0,4
7	0,6	—	—	—	0,2	0,6
8	0,6	—	0,2	—	0,2	0,4
9	0,6	0,025	0,2	—	0,2	0,2
10	0,6	0,025	0,2	0,2	0,2	—
11	0,6	0,050	0,2	0,2	0,2	—

* Альбумин используют только в опытах с митохондриями скелетных мышц.

** В случае митохондрий печени воды в каждую пробу добавляют на 0,2 мл больше.

Выделяют митохондрии. Полученный осадок ополаскивают раствором № 2 и суспендируют в той же среде. Для этого к осадку митохондрий, полученному из 10 г мышц, добавляют 1 мл раствора № 2, суспендируют, отбирают 0,1 мл на определение белка, оставшийся объем доводят той же средой до 12 мл. При работе с печенью осадок митохондрий суспендируют в 4 мл среды № 2.

В пробу № 11 добавляют 1 мл 1 М HClO₄, затем во все колбы вносят по 0,2 мл суспензии митохондрий, помещают пробу № 11 в лед, остальные закрепляют в штативе и инкубируют в термостате аппарата Варбурга 15 мин при температуре 26°С. После окончания инкубации во все пробы добавляют по 1 мл 1 М HClO₄, колбы помещают в лед и

через 15 мин фильтруют. Для определения неорганического фосфата отбирают по 1 мл фильтрата.

Рассчитывают во всех пробах АТФазную активность в микромолях фосфата неорганического Φ_n за 1 мин на 1 мг белка. Строят график зависимости скорости реакции от концентрации магния в присутствии ДНФ и без него.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аццоне Дж. Ф. Аденозинтрифосфатазные реакции в мышечных клетках//Труды V Междунар. биохим. конгр. Симп. 2. М., 1962. С. 286.
2. Слейтер Е. С. Механизм разобщения окислительного фосфорилирования нитро-фенолами//Труды V Междунар. биохим. конгр. Симп. 5. М., 1962. С. 343.
3. Акименко В. К. Белковые сопрягающие факторы окислительного фосфорилирования//Митохондрии. Регуляция процессов окисления и сопряжения. М., 1974. С. 26.

6. ИЗУЧЕНИЕ АТФАЗНОЙ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ АТФ-СИНТЕАЗНЫМ КОМПЛЕКСОМ МИТОХОНДРИЙ

Реакции синтеза и гидролиза АТФ катализируются АТФ-синтеазным комплексом, локализованным во внутренней мембране митохондрий. Обе реакции сопряжены с трансмембранным переносом H^+ . H^+ —АТФаза митохондрий сердца быка состоит из фактора F_1 и мембранного компонента F_0 . Фактор F_1 может быть отделен от мембраны и катализировать гидролиз АТФ в растворе. Реакция синтеза АТФ, сопряженная с трансмембранным переносом H^+ , протекает только в том случае, когда фактор F_1 связан с мембраной. Мембранный компонент АТФ-синтеазного комплекса образует «протонный канал», обеспечивая транспорт H^+ с внешней стороны митохондриальной мембраны к фактору F_1 , где находится активный центр фермента.

Известно, что субстратами для реакции гидролиза являются не только АТФ, но и другие нуклеозидтрифосфаты (НТФ). Скорость НТФазной реакции убывает в следующем порядке: АТФ $\gg$ ИТФ $>$ ГТФ $>$ УТФ $>$ ЦТФ. Не ясно, различаются ли между собой механизмы гидролиза АТФ и других НТФ.

Для протекания гидролазной реакции необходимы ионы двухвалентных металлов (Me^{2+}), в частности Mg^{2+} , но специфичность по металлу не является абсолютной.

Важным фактором, оказывающим влияние на гидролазную активность, является АДФ — продукт АТФазной и субстрат АТФ-синтеазной реакции. В определенных концентрациях АДФ ингибирует гидролиз АТФ по простому конкурентному типу торможения. Действие АДФ очень специфично. Только АДФ является ингибитором гидролиза АТФ и других НТФ. Известны активаторы АТФазы, действие которых обусловлено снятием торможения, вызванного АДФ. К таким активаторам относится, например, сульфит-ион.

Цель данной задачи — изучение АТФазной и ИТФазной активности СМЧ, выделенных из митохондрий сердца быка, а также сравнение действия АДФ, ИДФ и сульфит-иона на гидролиз этих НТФ.

Реактивы и оборудование:

1. Среда инкубации, содержащая 0,1 М KCl, 5 мМ трис-HCl (pH 8,0), 50 мкМ ЭДТА и 2 мМ $MgCl_2$.
2. АДФ — 25 мМ раствор (pH 8,0).

3. KHSO_3 — 0,5 М раствор.
4. Олигомицин — раствор 1 мг/мл (в перегнанном этаноле).
5. Mg—АТФ и Mg—ИТФ — 0,1 М растворы, рН 8,0.
6. Регистрирующий рН-метр с набором кювет и микропипеток.

Примечание. Растворы Mg—АТФ и Mg—ИТФ готовят растворением рассчитанной навески АТФ и ИТФ в небольшом объеме, доводят рН до нейтрального. Затем добавляют необходимый объем концентрированного раствора MgCl_2 , после чего смесь доводят до нужного объема.

Изучение АТФазной активности СМЧ. В качестве объекта исследования используют субмитохондриальные частицы, полученные из митохондрий сердца быка (см. с. 408).

АТФазную активность регистрируют рН-метрическим методом, который основан на том, что гидролиз АТФ при значениях рН, близких к нейтральным, приводит к появлению в среде ионов H^+ из-за различий в рК диссоциирующих групп субстрата (АТФ) и продуктов реакции (АДФ и $\text{P}_\text{н}$):



где n изменяется от 0 до 1 при изменении рН от 6,2 до 9,0. При рН 8,0 стехиометрия $\text{H}^+/\text{АДФ}$ составляет 0,9.

Измерение АТФазной активности проводят в кювете объемом 5 мл при комнатной температуре в среде следующего состава — 0,1 М KCl , 50 мкМ ЭДТА, 2 мМ MgCl_2 , 5 мМ трис- HCl (рН 8,0). В кювету перед измерением добавляют раствор Mg—АТФ до необходимой конечной концентрации. Линейность зависимости показания прибора от количества H^+ -ионов проверяют, добавляя в среду измерения небольшие порции раствора HCl известной концентрации. Реакцию начинают добавлением СМЧ в количестве примерно 0,5 мг на пробу. При добавлении СМЧ измеряется АТФазная активность, а начальная скорость реакции не связана с неспецифическим ответом электрода на добавку. Чтобы проверить это, реакцию можно начать неактивным ферментом, например олигомицином — специфическим ингибитором АТФазы, действующим на H^+ -канал необратимо. К порции СМФ добавляют олигомицин в стехиометрических количествах (из расчета 0,8 мкг олигомицина на 1 мг белка). После 5—10-минутной инкубации такие СМЧ добавляют в среду измерения активности и наблюдают неспецифическую реакцию электрода на эту добавку. Так как в ходе гидролиза уменьшается концентрация АТФ и накапливается ингибитор АДФ, скорость реакции падает. За истинную скорость принимают начальную скорость, которую определяют, проведя касательную к точке начала реакции или через несколько секунд после начала.

Изучение действия АДФ, ИДФ и сульфит-иона на АТФазную и ИТФазную активность СМЧ. При выполнении задачи гидролазные активности измеряют как указано выше в следующих условиях:

- 1) среда измерения содержит только Mg—АТФ или Mg—ИТФ в конечных концентрациях 1 мМ;
- 2) к среде, содержащей Mg—АТФ или Mg—ИТФ , добавляют KHSO_3 в конечной концентрации 5 мМ;
- 3) в пробу с АТФ или ИТФ добавляют АДФ в конечной концентрации 100 мкМ;
- 4) в пробу с АТФ или ИТФ добавляют KHSO_3 и АДФ в указанных выше концентрациях.

Определение константы Михаэлиса для АТФ и ИТФ. Все измерения проводят в присутствии KHSO_3 в конечной концентрации 5 мМ, который добавляют для снижения ингибирующего действия АДФ:

- 1) определяют начальную скорость АТФазной реакции в присутствии различных концентраций АТФ — от 20 мкМ до 2 мМ (6—8 значений концентраций);
- 2) определяют начальную скорость ИТФазной реакции в присутствии различных концентраций ИТФ — от 50 мкМ до 2 мМ (6—8 значений).

Строят графики зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в прямых координатах, а затем в координатах двойных обратных величин и определяют значения $K_{m\text{АТФ}}$ и $K_{m\text{ИТФ}}$.

ЛИТЕРАТУРА

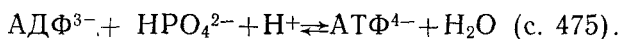
1. Акименко В. К., Минков И. Б., Бакеева Л. Е. и др. Выделение и свойства растворимой АТФазы митохондрий сердца быка//Биохимия. 1972. Т. 37, № 2. С. 348.
2. Виноградов А. Д. Каталитические свойства АТФ-синтетазы митохондрий//Биохимия. 1984. Т. 49, № 8. С. 1220.
3. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. М., 1979.

7. ВЛИЯНИЕ ВНУТРИМИТОХОНДРИАЛЬНОГО Ca^{2+} НА РЕАКЦИИ СИНТЕЗА И ГИДРОЛИЗА АТФ В МИТОХОНДРИЯХ

Ионы Ca^{2+} играют важную роль в регуляции многих биохимических реакций, протекающих в клетке. В поддержании низкой по сравнению с внеклеточным пространством концентрации ионизированного Ca^{2+} в цитоплазме принимают участие митохондрии. Эти внутриклеточные органеллы способны аккумулировать большие количества Ca^{2+} и вместе с тем им принадлежит решающая роль в обеспечении энергетических потребностей клетки в целом. Накопление Ca^{2+} в митохондриях существенно влияет на активность многих ферментов, локализованных в матриксе и катализирующих отдельные стадии цикла трикарбоновых кислот, окисления кетокислот с разветвленной цепью, липолиза и др. Ярким примером участия Ca^{2+} в регуляции собственных метаболических функций митохондрий является торможение окислительного фосфорилирования.

В настоящей работе предлагается количественно изучить зависимость скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крысы от содержания Ca^{2+} (или других двухвалентных катионов) в матриксе.

Экспериментальная задача может быть решена как с помощью полярографической техники (с. 480), так и путем непрерывной регистрации изменений рН среды в процессе активного транспорта Ca^{2+} и фосфорилирования добавленной затем АДФ в соответствии с уравнением



Реактивы и оборудование:

1. Реактивы для выделения митохондрий печени крысы (с. 406).
2. Среда инкубации, содержащая 0,15 М сахарозу, 75 мМ KCl , 2,5 мМ MgCl_2 и 5 мМ KH_2PO_4 (рН 7,4) — 50 мл.
3. Сукцинат калия — 1 М раствор, рН 7,4.

4. АДФ — $2 \cdot 10^{-2}$ М раствор, рН 7,4.
5. CaCl_2 — $5 \cdot 10^{-2}$, $4 \cdot 10^{-2}$, $3 \cdot 10^{-2}$, $2 \cdot 10^{-2}$ или $1 \cdot 10^{-2}$ М растворы. Готовят разведением титрованного раствора CaCl_2 (см. с. 484).
6. 2,4-динитрофенол — 10^{-2} М раствор, рН 7,4.
7. Рутениевый красный — 10^{-5} М раствор.
8. Ротенон — $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор в перегнанном этаноле.
9. HCl и KOH — 10^{-2} М растворы, готовят разведением титрованных растворов HCl и KOH .
10. Регистрирующий рН-метр или полярограф с наборами кювет и микропипеток объемом 10—20 мкл (4—5 шт.) и 40—60 мкл (1 шт.).

Отмытые и подсушенные кусочком фильтровальной бумаги электроды полярографа (или рН-метра) осторожно погружают в кювету с 2 мл среды инкубации (в которую предварительно добавлен $5 \cdot 10^{-6}$ М ротенон) до полного удаления воздуха из пространства над поверхностью жидкости. Включают самописец и с помощью потенциометра «Чувствительность» устанавливают максимальное значение тока, соответствующее исходному содержанию кислорода в среде. Убедившись в отсутствии изменений тока во времени (дрейф), в кювету добавляют около 40 мкл густой суспензии митохондрий (4—5 мг белка) и через 1—2 мин реакцию начинают добавлением 5—10 мМ сукцината. Регистрируют окисление сукцината в контролируемом состоянии, происходящее с постоянной скоростью на протяжении 1—2 мин. После этого в кювету добавляют 200 мкМ АДФ и регистрируют быстрое окисление сукцината в процессе окислительного фосфорилирования. Спустя некоторое время скорость дыхания замедляется, что связано с переходом митохондрий в контролируемое состояние при исчерпании АДФ. Дыхание регистрируют еще 1—2 мин, после чего в кювету добавляют АДФ или 50 мкМ ДНФ для быстрого исчерпания кислорода в среде. Из проведенного опыта убеждаются в высокой степени сопряженности препарата митохондрий и рассчитывают скорость окислительного фосфорилирования и коэффициент АДФ/О.

В следующей пробе измеряют максимальную сукцинатоксидазную активность митохондрий (в присутствии 40 мкМ ДНФ). Убеждаются в том, что скорость дыхания в присутствии АДФ составляет около 70—80% от максимальной сукцинатоксидазной активности.

Далее оценивают способность митохондрий аккумулировать добавленный Ca^{2+} . С этой целью в кювету, содержащую митохондрии и сукцинат, последовательно добавляют небольшие количества Ca^{2+} (по 50—100 мкМ) и регистрируют кратковременную активацию дыхания, сменяющуюся переходом в контролируемое состояние (замедление дыхания вследствие поглощения добавленного Ca^{2+}). Добавление Ca^{2+} прекращают, когда очередная порция Ca^{2+} приводит к развивающейся во времени спонтанной активации дыхания.

Для изучения ингибирующего действия Ca^{2+} на процесс окислительного фосфорилирования к инкубируемому в присутствии сукцината митохондриям добавляют различные (увеличивающиеся в каждой следующей пробе) количества Ca^{2+} . После аккумуляции катиона и перехода в контролируемое состояние в пробы добавляют 200 мкМ АДФ и регистрируют скорость окислительного фосфорилирования в нагруженных Ca^{2+} митохондриях. В специальных опытах убеждаются в том, что накопление Ca^{2+} не приводит к уменьшению сукцинатоксидазной активности митохондрий. С этой целью к инкубируемому в среде с сукцинатом и нагруженным различными количествами Ca^{2+} митохондриям

добавляют 50 мкМ ДНФ и регистрируют дыхание до полного истощения кислорода.

Присутствие Ca^{2+} в окружающей среде не влияет на процесс окислительного фосфорилирования. В этом убеждает следующий опыт. К митохондриям, инкубируемым в среде с сукцинатом, добавляют 10^{-7} М рутениевый красный. Из-за инактивации системы транспорта Ca^{2+} последующее добавление катиона не вызывает обратимой активации дыхания. Добавление АДФ в таких условиях (весь добавленный Ca^{2+} остается в среде инкубации) приводит к активации дыхания, степень которой не отличается от контроля (сравни с первой пробой).

На основании проведенных измерений строят графическую зависимость скорости дыхания митохондрий в присутствии ДНФ и АДФ, скорости окислительного фосфорилирования и коэффициентов АДР/О и ДК от количества предварительно накопленного Ca^{2+} в матриксе митохондрий. Если вследствие ограниченной емкости препарата митохондрий для Ca^{2+} степень торможения окислительного фосфорилирования невелика, то для проведения этих опытов можно рекомендовать увеличение концентрации Mg^{2+} , увеличение рН среды (до $\sim 7,8$), увеличение буферной емкости среды или добавление в среду инкубации 50—100 мкМ ионола (антиоксидант). Каждая из перечисленных модификаций предотвращает спонтанную активацию дыхания в нагруженных Ca^{2+} митохондриях.

Для более углубленного изучения рассматриваемого явления предлагается провести следующие самостоятельные исследования:

1. Изучить влияние накопленного в матриксе Ca^{2+} на кинетику гидролиза АТФ в митохондриях. Процесс гидролиза АТФ в митохондриях регистрируют рН-метрическим методом (с. 475). При проведении этого исследования следует иметь в виду, что процесс аккумуляции Ca^{2+} в митохондриях может протекать в отсутствие субстратов дыхательной цепи (а также в анаэробных условиях) за счет энергии, освобождающейся в процессе гидролиза АТФ. Кроме того, прочносопряженные митохондрии в таких условиях катализируют гидролиз АТФ с очень низкой скоростью. В связи с этим в предварительных экспериментах измеряют зависимость скорости гидролиза АТФ в митохондриях от концентрации разобщителя (ДНФ). В дальнейшем измерения скорости гидролиза АТФ в предварительно нагруженных Ca^{2+} митохондриях проводятся после добавления насыщающих концентраций ДНФ. Чтобы исключить возможность быстрого выхода Ca^{2+} из матрикса под действием ДНФ (проверяют в специальных опытах), добавлению разобщителя должна предшествовать обработка нагруженных Ca^{2+} митохондрий 10^{-7} М рутениевым красным. Результаты исследования представляют в виде графической зависимости скорости ДНФ-индуцируемого гидролиза АТФ от количества Ca^{2+} в матриксе митохондрий.

2. Сравнить действие Ca^{2+} и других проникающих двухвалентных катионов (Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+}) на процесс окислительного фосфорилирования и гидролиза АТФ в митохондриях.

3. Продемонстрировать обратимость (или необратимость) вызванных накоплением Ca^{2+} в матриксе изменений скорости АТФ-синтезной и АТФ-гидролазной реакций. Для проведения этого исследования следует воспользоваться ионофором А23187, катализирующим электронейтральный $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ -обмен через мембрану. Обработка нагруженных Ca^{2+} митохондрий ионофором А23187 в присутствии избытка ЭГТА в среде приведет к быстрому выходу Ca^{2+} из матрикса.

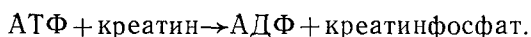
ЛИТЕРАТУРА

1. Лейкин Ю. Н., Виноградов А. Д. Взаимоотношение процессов окислительного фосфорилирования и транспорта ионов Ca^{2+} в митохондриях//Укр. биохим. журн. 1971. Т. 43, № 1. С. 88.
2. Gomez-Puyou A., Gomez-Puyou M. T., Klapp M. et al. Effect of calcium on the translocation of adenine nucleotides in rat liver mitochondria//Arch. Biochem. Biophys. 1979. Vol. 194. P. 399.
3. Villalobo A., Lehninger A. L. Inhibition of oxidative phosphorylation in ascites tumor mitochondria and cells by intramitochondrial Ca^{2+} //J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 2457.
4. Yamada E. W., Shiffman F. H., Huzel N. J. Ca^{2+} -regulated release of an ATPase inhibitor protein from submitochondrial particles derived from skeletal muscle of the rat//J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 267.
5. Hillered L., Muchiri P. M., Nordenbrand K. et al. Mn^{2+} prevents the Ca^{2+} -induced inhibition of ATP synthesis in brain mitochondria//FEBS Lett. 1983. Vol. 154. P. 247.

8. КРЕАТИНКИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Ткани, имеющие большой динамический диапазон энергетического обмена (скелетная и сердечная мышцы), а также мозг содержат креатинкиназу (с. 291). Во внутренней мембране митохондрий скелетных мышц, сердца и мозга содержится креатинкиназа, отличная по электрофоретической подвижности и термоллабильности от трех изоферментов креатинкиназы цитоплазмы. Активность креатинкиназы в митохондриях достаточна для того, чтобы в присутствии избытка креатина обеспечить превращение всего образующегося в процессе окислительного фосфорилирования АТФ в креатинфосфат. Освобождающийся при этом АДФ вновь фосфорилируется в митохондриях. Таким образом, высокая активность креатинкиназы в митохондриях может поддерживать работу дыхательной цепи на постоянно высоком уровне в тканях, лишь периодически испытывающих потребность в большом количестве АТФ.

Изучение кинетических параметров, а также условий протекания креатинкиназной реакции в митохондриях привело к предположению о том, что митохондриальный изозим катализирует прямую реакцию:



Было также высказано предположение о том, что именно креатинфосфат является той формой высокоэнергетического фосфата, которая переносится из митохондрий в другие части клетки. В настоящей работе предлагается ознакомиться с влиянием креатина на дыхание митохондрий сердца и определить $S_{0,5}$ митохондриальной креатинкиназы для креатина и АТФ.

Реактивы:

1. Реактивы для выделения митохондрий сердца (с. 405).
2. Среди инкубации: 0,3 М сахараза, 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl_2 (концентрацию исходного раствора MgCl_2 определяют титрованием ЭДТА с эриохромовым черным Т) (с. 484), 5 мМ KH_2PO_4 (рН 7,4), 20 мМ трис-HCl, рН 7,4, 5 мМ сукцинат калия, 2,5 мкМ ротенон (раствор готовят на перегнанном этиловом спирте), креатин (от 0 до 20 мМ).
3. АДФ — 0,03 М раствор, рН 7,4.
4. АТФ — 5 мМ раствор, рН 7,4.

Выделяют митохондрии сердца (с. 405). В первой серии опытов в кювету полярографа (с. 480) помещают 2 мл среды инкубации, погружают электроды и устанавливают перо самописца в крайнее положение шкалы. Реакцию начинают добавлением 0,04 мл суспензии митохондрий (2—3 мг белка). Через 2 мин в кювету добавляют 300 мкМ АДФ.

После выхода митохондрий в контролируемое состояние делают повторную добавку АДФ. Проводят аналогичные записи с пробами, содержащими 2,5, 5, 10, 15 и 20 мМ креатина.

Во второй серии опытов регистрируют ответ митохондрий на последовательное добавление шести добавок АТФ по 50 мкМ в отсутствие 2,5, 5, 10, 15 и 20 мМ креатин.

Для всех проб рассчитывают скорости потребления кислорода в различных состояниях, величины дыхательного контроля и АДФ/О. Строят графическую зависимость скорости дыхания в состоянии 4 от концентрации креатина в пробе (по результатам первой серии опытов) и зависимость скорости дыхания от концентрации АТФ в отсутствие креатина и в присутствии 10 или 20 мМ креатина (по результатам второй серии опытов). Находят значения $S_{0,5}$ для креатина и АТФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jacobus W. S., Lehninger A. L. Creatine kinase of rat heart mitochondria//J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248. P. 4803.
2. Vial C., Godinot C., Gautheron D. Membranes creatine kinase in pig heart mitochondria. Properties and role in phosphate potential regulation//Biochemie. 1972. Vol. 54. P. 843.

ВИ. НЕКОТОРЫЕ МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕТАБОЛИЗМА МИТОХОНДРИЙ

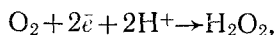
1. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА

Одним из основных параметров, характеризующих обмен выделенных митохондрий, является их способность к поглощению кислорода и зависимость скорости дыхания от присутствия акцепторной системы (АДФ+Ф_н) (см. также с. 462). В связи с этим для изучения метаболизма митохондрий необходимо иметь метод, позволяющий точно измерить поглощение кислорода при окислении митохондриями тех или иных субстратов.

Хорошо известным и широко распространенным способом измерения дыхания является манометрический метод Варбурга. Однако этот метод имеет ряд недостатков. К числу наиболее существенных относятся: длительное время предварительной инкубации, необходимое для выравнивания температуры (10—15 мин), трудность автоматической регистрации. В связи с этим область применения манометрического метода ограничена, и для изучения быстрой динамики дыхания аппарата Варбурга оказывается непригодным.

Чрезвычайно плодотворным оказалось применение для этих целей полярографического метода измерения концентрации кислорода с использованием стационарных твердых электродов.

Полярографический метод основан на электрохимической реакции восстановления растворенного кислорода до перекиси водорода и воды:



Зависимость тока, обусловленного электрохимической реакцией, от потенциала рабочего электрода изображается в виде «полярографической волны» (рис. 61).

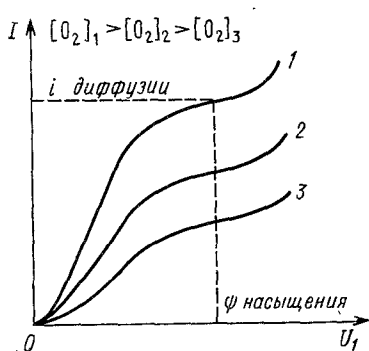


Рис. 61. Зависимость тока (I) в цепи от потенциала рабочего электрода (U)

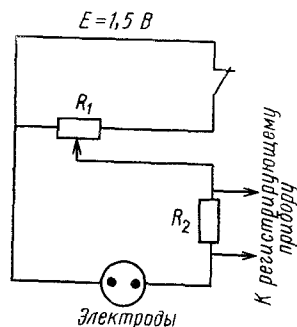


Рис. 62. Принципиальная электрическая схема полярографа

В условиях полного перемешивания ток в области насыщения пропорционален скорости диффузии вещества (кислорода) из массы раствора в приэлектродный слой. Скорость диффузии согласно закону Фика линейно зависит от градиента концентрации вещества. Так как полярографический анализ проводят в условиях, когда электрохимическая реакция на электроде не лимитирует скорости процесса, концентрация кислорода в приэлектродном слое близка к нулю и ток в цепи пропорционален концентрации растворенного кислорода в общей массе раствора.

Линейная зависимость тока от концентрации кислорода при потенциале насыщения осуществляется в широком диапазоне концентраций, вполне достаточном для измерения дыхания биологических объектов, поэтому полярографический метод измерения потребления кислорода получил широкое распространение для изучения газообмена тканей и суспензий выделенных клеточных органелл.

Наиболее часто в этом методе применяют электрод Кларка, в котором рабочая поверхность платины отделена от реакционной среды тонкой тefлоновой мембраной. Растворенный кислород диффундирует из реакционной смеси через мембрану в насыщенный раствор KCl , где происходит электрохимическая реакция восстановления. Наряду с достоинствами, обусловленными полной изоляцией платины от реакционной смеси, простотой изготовления и высокостабильными результатами, такой электрод имеет ряд недостатков. Главный из них — большая (порядка нескольких секунд) постоянная времени. В связи с этим был применен метод регистрации напряжения кислорода с использованием подвижных платиновых электродов, покрытых тонкой

пленкой полимера. Более подробное и полное описание принципов полярографии можно найти в соответствующих руководствах (Виноградова, 1963).

Принципиальная электрическая схема полярографа. На рис. 62 изображена схема полярографической установки. Напряжение от источника E подается на низкоомное переменное сопротивление R_1 (150—200 Ом). С помощью движка сопротивления R_1 потенциал рабочего электрода относительно электрода сравнения может быть установлен на любую величину в интервале 0—1,5 В. Ток, протекающий в цепи во время электрохимической реакции, создает на сопротивлении R_2 (100 Ом) падение напряжения, которое может быть зарегистрировано любым подходящим прибором. Разность потенциалов между рабочим и вспомогательным электродами контролируется ламповым вольтметром с входным сопротивлением около 10 МОм.

В качестве регистрирующего прибора использован самопишущий потенциометр КСП-4 со шкалой 0—10 мВ и постоянной времени 1—2,5 с. Так как ток в цепи ячейки мал (20 мкА), использование всей шкалы самописца требует либо дополнительного усиления сигнала, либо увеличения чувствительности прибора. Последнее достигается введением в диагональ измерительного моста потенциометра магазина сопротивлений (общее сопротивление ~ 4 кОм), позволяющего ступенчато изменять ток в измерительной схеме прибора. Электронный усилитель самописца имеет малый запас коэффициента усиления, так что вводимое в диагональ моста дополнительное сопротивление позволяет увеличить чувствительность прибора в десять раз без видимого ухудшения его работы.

Рабочий электрод. В качестве рабочего электрода использована платиновая проволока диаметром около 0,5 мм. Кусок проволоки длиной 1 см промывают концентрированной азотной кислотой и несколько раз прокалывают. Проволоку варивают в трубку из простого стекла диаметром 3,5 мм⁷. Рабочая длина платиновой проволоки равна 3—5 мм. Видимая рабочая поверхность платины составляет около 7 мм², свободный конец ее слегка отогнут для лучшего перемешивания раствора при вращении. Перед употреблением электрод хранят в дистиллированной воде. Стекланную трубку с вваренным в нее электродом заполняют ртутью. В верхний свободный конец вводят тонкую платиновую проволоку для обеспечения надежного подвижного контакта между рабочим электродом и электрической схемой прибора. Электрод закрепляют во втулке с подшипником. Вращение электрода обеспечивается синхронным электродвигателем (3000 об/мин). Для стабильной работы прибора необходимо постоянство скорости вращения электрода, так как регистрируемый диффузионный ток сильно зависит от перемешивания исследуемой жидкости.

Электрод сравнения. В качестве неполяризующегося обратимого электрода обычно применяют насыщенный хлорсеребряный электрод. Для его изготовления используют пластину серебра размером 3×5 см, поверхность которой очищают механически и обезжиривают эфиром. Серебро хлорируют электрохимически в насыщенном растворе KCl при плотности тока 0,3 мА/см² в течение 2 ч. Изогнутую в виде трубки хлорированную пластину помещают в небольшую делительную воронку,

⁷ Обычно применяющееся в лабораториях электровакуумное стекло для этой цели непригодно, так как его коэффициент температурного расширения значительно отличается от такового для платины, что приводит к образованию микротрещин в области спая и неконтролируемым нестабильностям работы прибора.

заполненную насыщенным раствором KCl ; нижний конец воронки соединен с агаровым сифоном, приготовленным из 3%-ного раствора агара на насыщенном KCl . Внутренний диаметр агарового мостика — 2 мм; высота агарового столбика — 1,5 см. Делительная воронка изолирована от света. В нерабочем состоянии агаровый сифон погружают в раствор KCl .

Проверка прибора. Для измерения дыхания необходимо установить, при каком потенциале на электроде достигается ток насыщения. Значение потенциала может отличаться от теоретического в зависимости от омического сопротивления ячейки, хлорсеребряного электрода и т. д. Рабочее значение потенциала составляет 700 мВ.

После выбора значения потенциала платинового электрода необходимо проверить работу полярографа с использованием объекта, поглощающего кислород. Для этой цели удобно пользоваться густой суспензией пекарских дрожжей, дважды промытых водопроводной водой и суспендированных в 0,9%-ном растворе KCl с добавлением 1%-ной глюкозы. Изменение тока в цепи при добавлении дрожжей в ячейку изображено на рис. 63.

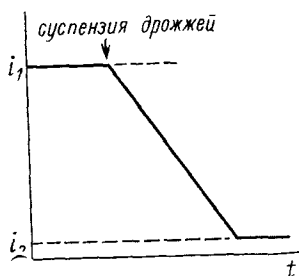


Рис. 63. Поглощение кислорода в суспензии дрожжей в ячейке полярографа, заполненной 0,9% KCl , содержащим 1%-ную глюкозу

Для измерения скорости дыхания определяют цену деления прибора-регистратора в концентрационных единицах растворенного кислорода. Принимают, что при комнатной температуре и атмосферном давлении растворимость кислорода в обычно используемых средах инкубации равна $2,5 \cdot 10^{-4}$ М. Скорость дыхания обычно выражают в мкг-атомах поглощенного за 1 мин кислорода, отнесенных к 1 мг белка использованного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Умбрейт В. В. и др. Манометрические методы тканевого обмена. М., 1951.
2. Кондрашов Г. И. Ингибирование сукцинатоксидазной системы митохондрий щавелевоуксусной кислотой. Рукопись дипл. работы, хранящейся на кафедре биохимии биологического ф-та МГУ. М., 1967.
3. Виноградова Е. Н. и др. Методы полярографического и амперометрического анализа. М., 1963.
4. Методы практической биохимии/Под ред. Б. Уильямса и К. Уилсона. М., 1978.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА МИТОХОНДРИЙ И СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦ С БИУРЕТОВЫМ РЕАКТИВОМ

Так как мембранные образования клетки характеризуются высоким содержанием липидов, для растворения белка используют 2 н. раствор КОН, содержащий 1%-ный дезоксихолат.

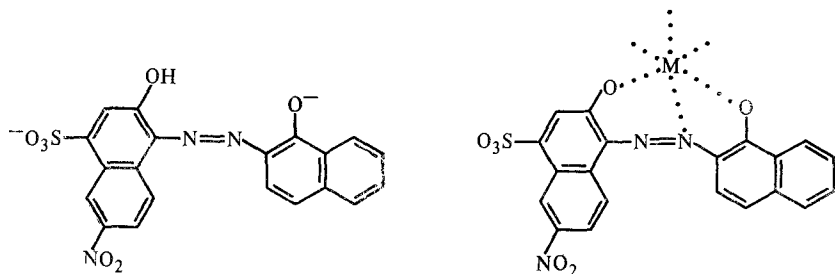
К 0,05 мл густой суспензии митохондрий или препарата Кейлина—Хартри добавляют 0,95 мл 2 н. КОН и 10 мг дезоксихолата. После полного растворения белка (до исчезновения мути) добавляют 4 мл стандартного биуретового реактива (с. 80), тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Одновременно готовят контрольную пробу (2 мл 2 н. КОН, 20 мг дезоксихолата, 8 мл биуретового реактива). Колориметрируют при 540 нм в кюветах толщиной 10 мм. Содержание белка находят по заранее построенной калибровочной кривой (сывороточный альбумин в концентрации от 1 до 10 мг/мл).

ЛИТЕРАТУРА

Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction//J. Biol. Chem. 1949. Vol. 177. P. 751.

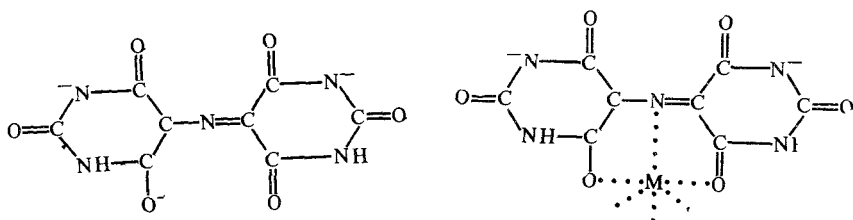
3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРОВ МАГНИЯ И КАЛЬЦИЯ МЕТОДОМ КОМПЛЕКСОНОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

В щелочной среде ($\text{pH} > 10$) ЭДТА образует с Mg^{2+} и Ca^{2+} очень устойчивые комплексы: логарифм константы устойчивости для комплекса с Mg^{2+} при 20°C и $I=0,1$ равен 8,7, а для комплекса с Ca^{2+} — 10,7. В щелочной среде растворы Mg^{2+} и Ca^{2+} можно титровать раствором ЭДТА, при этом вблизи точки эквивалентности наблюдается резкий скачок концентрации ионов металла, подобно тому как при титровании сильной кислоты сильным основанием вблизи точки эквивалентности наблюдается резкий скачок концентрации ионов водорода. Конец титрования устанавливают с помощью металлохромных индикаторов. Они образуют комплексы с Mg^{2+} или Ca^{2+} , причем образование комплекса (или его распад) сопровождается изменением окраски индикаторов. При добавлении ЭДТА к раствору, содержащему один из катионов и соответствующий индикатор, происходит вытеснение индикатора из комплекса с металлом и образуется комплекс металла с ЭДТА. Комплекс металла с индикатором окрашен иначе, чем свободный индикатор, в результате при связывании всего металла в комплекс с ЭДТА происходит изменение окраски раствора. Индикатор подбирают таким образом, чтобы переход окраски наблюдался в зоне резкого изменения концентрации катиона, наступающего вблизи точки эквивалентности при титровании ЭДТА. Для титрования раствора Mg^{2+} используют азокраситель эриохром черный Т:



Во время титрования при $\text{pH} 10$ в точке эквивалентности происходит переход красного металлокомплекса индикатора в свободный,

окрашенный в синий цвет эриохром черный Т. Для титрования Ca^{2+} используют аммонийную соль пурпуровой кислоты — мурексид (можно использовать также и эриохром черный Т).



Во время титрования при $\text{pH} > 11$ происходит переход красного металлокомплекса мурексида в свободный мурексид сине-фиолетового цвета.

Концентрация титруемых металлов обычно составляет 10^{-4} — 10^{-2} М.

Определение концентрации Mg^{2+}

Реактивы:

1. ЭДТА — 0,01 М раствор. Готовят растворением в бидистиллированной воде динатриевой соли с молекулярным весом 372,16 Да. Раствор хранят в полиэтиленовом сосуде.
2. Эриохром черный Т. Растирают 0,025 г эриохрома черного Т с 10 NaCl в тонкий пылевидный порошок.
3. Аммиачный буферный раствор ($\text{pH} 10$): 7 г NH_4Cl смешивают с 57 мл концентрированного раствора аммиака (плотность 0,90) и разбавляют до 10 мл. Раствор хранят в полиэтиленовом сосуде.
4. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, химически чистый.

Готовят исследуемый раствор $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (приблизительно 0,01 М).

В колбу на 100 мл наливают 40 мл бидистиллированной воды, 2 мл аммиачного буфера, точно 5 мл исследуемого раствора MgCl_2 , добавляют на кончике шпателя эриохром черный С. С помощью бюретки титруют раствор ЭДТА до перехода красной окраски в синюю. С последней каплей ЭДТА должен исчезнуть красноватый оттенок индикатора. Так как реакции комплексообразования протекают не мгновенно, вблизи конечной точки титрование замедляют.

Определение концентрации Ca^{2+}

Реактивы:

1. ЭДТА — 0,01 М раствор (приготовление см. выше).
2. Мурексид: растирают 0,1 г мурексида и 10 г NaCl.
3. NaOH — 1 М раствор (хранят в полиэтиленовом сосуде).
4. CaCl_2 — химически чистый.

Готовят исследуемый раствор CaCl_2 (приблизительно 0,01 М). В колбу на 100 мл наливают 40 мл дважды дистиллированной воды,

5 мл 1 М раствора NaOH, точно 5 мл исследуемого раствора CaCl_2 , добавляют на кончике шпателя мурексид. Тотчас титруют раствором ЭДТА до перехода красной окраски в фиолетовую. Титрование следует начинать как можно быстрее после прибавления NaOH во избежание выпадения осадка CaCO_3 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Шварцейбах Г., Флашка Г. Комплексометрическое титрование. М., 1970.
2. Пршибил Р. Комплексоны в химическом анализе. М., 1960.

ПРИЛОЖЕНИЕ

*Плотности и концентрации растворов
соляной кислоты*

Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация HCl	
	г/100 г раство- ра (вес %)	моль/л
1,100	20,39	6,150
1,110	22,33	6,796
1,120	24,25	7,449
1,130	26,20	8,118
1,140	28,18	8,809
1,150	30,14	9,505
1,160	32,14	10,225
1,170	34,18	10,97
1,180	36,23	11,73
1,185	37,27	12,11
1,190	38,32	12,50
1,195	39,37	12,90
1,198	40,00	13,14

*Плотности и концентрации растворов
серной кислоты*

Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация H₂SO₄	
	г/100 г раство- ра (вес %)	моль/л
1,100	14,73	1,652
1,200	27,72	3,391
1,300	39,68	5,259
1,400	50,50	7,208
1,500	60,17	9,202
1,600	69,09	11,27
1,700	77,63	13,46
1,800	87,69	16,09
1,810	89,23	16,47
1,820	91,11	16,91
1,830	93,64	17,47
1,831	93,94	17,54
1,832	94,32	17,62
1,833	94,72	17,70
1,834	95,12	17,79
1,835	95,72	17,91

Плотности и концентрации растворов хлорной кислоты

Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация HClO₄	
	г/100 г раствора (вес.%)	моль/л
1,005	1,00	0,1004
1,030	5,25	0,5383
1,060	10,06	1,061
1,095	15,28	1,665
1,130	20,26	2,279
1,165	24,94	2,892
1,205	29,86	3,582
1,300	40,10	5,189
1,410	50,10	7,032
1,540	60,04	9,203
1,675	70,15	11,70

Плотности и концентрации растворов уксусной кислоты

Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация CH₃COOH		Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация CH₃COOH	
	г/100 г раствора (вес %)	моль/л		г/100 г раствора (вес %)	моль/л
1,000	1,20	0,200	1,050	40,2	7,08
1,005	4,64	0,777	1,055	46,9	8,24
1,010	8,14	1,37	1,060	53,4	9,43
1,015	11,7	1,98	1,065	61,4	10,9
1,020	15,4	2,61	1,070	77—79*	13,7—14,1
1,025	19,2	3,27	1,075	91,2	16,2
1,030	23,1	3,96	1,080	95,4	16,8
1,035	27,2	4,68	1,085	98,0	17,2
1,040	31,6	5,46	1,090	99,9	17,5
1,045	36,2	6,30			

* Уксусная кислота в указанных границах концентраций имеет плотность 1,0700 г/см³ с отклонениями меньше 0,0001. Поскольку дальнейшее повышение концентрации приводит снова к уменьшению плотности, для установления, какая из двух возможных концентраций отвечает найденной плотности (например, при плотности 1,060 г/см³, будет ли концентрация раствора равной 53,4 или 95,4%), приливают к пробе уксусной кислоты немного воды. Если плотность уменьшается, надо взять меньшую концентрацию (в указанном примере 53,4%), если плотность увеличится, то берут большую концентрацию (в данном случае 95,4%).

Плотности и концентрации растворов едкого натра

Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация NaOH		Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация NaOH	
	г/100 г раствора (вес %)	моль/л		г/100 г раствора (вес.%)	моль/л
1,100	9,19	2,527	1,360	33,06	11,24
1,120	11,01	3,082	1,380	35,01	12,08
1,140	12,83	3,655	1,400	36,99	12,95
1,160	14,64	4,244	1,420	38,99	13,84
1,180	16,44	4,850	1,440	41,03	14,77
1,200	18,25 ₅	5,476	1,460	43,64	15,98
1,220	20,07	6,122	1,480	45,22	16,63
1,240	21,90	6,788	1,500	47,33	17,75
1,260	23,73	7,475	1,510	48,38	18,27
1,280	25,56	8,178	1,515	48,90 ₅	18,52
1,300	27,41	8,906	1,520	49,44	18,78
1,320	29,26	9,656	1,525	49,97	19,05
1,340	31,14	10,43	1,530	50,50	19,31

Плотности и концентрации растворов едкого кали

Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация KOH		Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация KOH	
	г/100 г раствора (вес %)	моль/л		г/100 г раствора (вес. %)	моль/л
1,100	11,03	2,16	1,360	36,73 ₅	8,90 ₅
1,120	13,14	2,62	1,380	38,56	9,48
1,140	15,22	3,09	1,400	40,37	10,07
1,160	17,29	3,58	1,420	42,15 ₅	10,67
1,180	19,35	4,07	1,440	43,92	11,28
1,200	21,38	4,57	1,460	45,66	11,88
1,220	23,38	5,08	1,480	47,39	12,50
1,240	25,36	5,60	1,500	49,10	13,13
1,260	27,32	6,13 ₅	1,510	49,95	13,45
1,280	29,25	6,67	1,520	50,80	13,76
1,300	31,15	7,22	1,525	51,22	13,92
1,320	33,03	7,77	1,530	51,64	14,08
1,340	34,90	8,33	1,535	52,05	14,24

Плотности и концентрации аммиака

Плотность при 20°C, г/см³	Концентрация NH ₃	
	г/100 г раствора (вес %)	моль/л
0,990	1,89	1,10
0,980	4,27	2,46
0,970	6,75	3,84
0,960	9,34	5,27
0,950	12,03	6,71
0,940	14,88	8,21
0,930	17,85	9,75
0,920	20,88	11,28
0,910	24,03	12,84
0,900	27,33	14,44
0,890	30,68 ₅	16,04
0,880	34,35	17,75

*Концентрация и удельный вес концентрированных
и гидроокиси аммония*

Название	Молекулярный вес	Удельный вес	Процентная концентрация	Молярность (нормальность)	Количество на 1 л для приготовления молярного раствора (нормального раствора)
Аммиак	35,04	0,91	25	13,3	75,1
		0,88	35	18,1	55,2
Азотная кислота	63,02	1,42	70	15,7	63,7
Муравьиная кислота	46,03	1,205	90	23,6	42,4
	46,03	1,22	98	25,9	38,5
Серная кислота	98,08	1,835	98	18,3 ($n = 36,7$)	54,5 ($n = 27,3$)
Соляная кислота	36,45	1,18	36	11,6	85,9
Уксусная кислота	60,05	1,05	99,6	17,4	57,5
Фосфорная кислота	98	1,75	90	16,0 ($n = 48,1$)	62,4 ($n = 20,8$)
Хлорная кислота	100,46	1,54	60	9,2	108,8

Удельный вес водных растворов этилового спирта

Удельный вес $\frac{20}{4}^{\circ}\text{C}$	% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$		Удельный вес $\frac{20}{4}^{\circ}\text{C}$	% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	
	по весу	по объему		по весу	по объему
0,960	26,2	31,8	0,845	79,4	85,0
0,950	32,2	38,8	0,840	81,4	86,6
0,940	37,6	44,8	0,835	83,4	88,2
0,930	42,6	50,2	0,830	85,4	89,8
0,920	47,3	55,1	0,825	87,3	91,2
0,910	51,8	59,7	0,820	89,2	92,7
0,900	56,2	64,0	0,815	91,1	94,1
0,890	60,5	68,2	0,810	93,0	95,4
0,880	64,8	72,2	0,805	94,7	96,6
0,870	69,0	76,1	0,800	96,5	97,7
0,860	73,2	79,7	0,795	98,2	98,9
0,855	75,3	81,5	0,791	99,5	99,7
0,850	77,3	83,3			

№ п/п	Наименование	pK	Интервал перехода окраски pH	Окраска в кислой среде	Окраска в щелочной среде	Концентрация, %	Растворитель
1	Кристаллфиолетовый		0,0—2,0	зеленая	фиолетовая	—	вода
2	Тимоловый синий (1-й переход), см. 17	1,7	1,2—2,8	красная	желтая	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 4,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
3	Тропеолин 00		1,3—3,0	красная	желтая	1,0, 0,1 и 0,01	вода
4	Крезоловый красный (1-й переход), см. 16		0,9—1,8	красная	желтая	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 5,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
5	Метиловый желтый (диметиламиноазобензол)		2,9—4,0	красная	желтая	0,1 и 0,01	90°-ный спирт
6	Бромфеноловый спирт	3,87	3,0—4,6	желтая	синяя	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 3,0 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
7	Метиловый оранжевый	3,5	3,1—4,4	красная	оранжево-желтая	0,1	вода
8	Бромкрезоловый синий (бром-крезоловый зеленый)		3,8—5,4	желтая	синяя	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 2,9 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
9	Конго рот		3,0—5,2	синяя	красная		
10	Лакмус		5,0—8,0	красная	синяя		
11	Метиловый красный	5,0	4,4—6,2	красная	желтая	0,1 и 0,2	60°-ный спирт
12	Хлорфеноловый красный		5,6—6,6	желтая	красная	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 4,7 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора

Продолжение

№ п/п	Наименование	pK	Интервал перехода окраски pH	Окраска в кислой среде	Окраска в щелочной среде	Концентрация, %	Растворитель
13	Бромтимоловый синий	7,1	6,0—7,6	желтая	синяя	0,05	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 3,2 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
14	Нейтральный красный		6,8—8,0	красная	янтарно-желтая	0,1	60°-ный спирт
15	Феноловый красный	7,8	6,8—8,0	желтая	красная	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 5,7 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
16	Крезоловый красный (2-й переход), см. 4		7,2—8,8	янтарно-желтая	пурпурно-красная	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 5,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
17	Тимоловый синий (2-й переход), см. 2	8,9	8,0—9,6	желтая	синяя	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 4,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора
18	Фенолфталеин	9,7	8,2—10,0	бесцветная	пурпурная	0,1 и 1,0	60°-ный спирт
19	Тимолфталеин		9,3—10,5	бесцветная	синяя	0,1	90°-ный спирт
20	Ализариновый желтый		10,1—12,1	желтая	оранжевая	0,1	вода
21	Тропеолин 0		11,0—13,0	желтая	оранжево-коричневая	0,1	вода

Охлаждающие смеси

Соль	Лед, соль	Предельная температура, °С
KCl	10:3	—11
NH ₄ Cl	4:1	—15
NaCl	3:1	—21
CaCl ₂ ·6H ₂ O	3:5	—39
	2:3	—49
	7:10	—55

Охлаждающие смеси, основанные на органических растворителях с сухим льдом

Органический растворитель	Предельная температура, °С
Этиловый спирт	—75
Ацетон	—86
Эфир	—90

Буферные растворы

1. Глицин — HCl буфер (0,05 М),

pH 2,2—3,6

Глицин, м. м. = 75,07

pH	0,2 М глицин, мл	0,2 М, HCl, мл	H ₂ O, мл
2,2	50	44,0	до 200
2,4	50	32,4	» 200
2,6	50	24,2	» 200
2,8	50	16,8	» 200
3,0	50	11,4	» 200
3,2	50	8,2	» 200
3,4	50	6,4	» 200
3,6	50	5,0	» 200

2. Цитратный буфер (0,1 М), pH 3,0—6,2

Лимонная кислота · H₂O, м. м. = 210,14
Трехзамещенный цитрат натрия 2H₂O, м. м. — 294,12

pH	Лимонная кислота (0,1 М), мл	Трехзамещенный цитрат натрия (0,1 М), мл
3,0	16,4	3,6
3,2	15,5	4,5
3,4	14,6	5,4
3,6	13,7	6,3
3,8	12,7	7,3
4,0	11,8	8,2
4,2	10,8	9,2
4,4	9,9	10,1
4,6	8,9	11,1
4,8	8,0	12,0
5,0	7,0	13,0
5,2	6,1	13,9
5,4	5,1	14,9
5,6	4,2	15,8
5,8	3,2	16,8
6,0	2,3	17,7
6,2	1,6	18,4

3. Ацетатный буфер (0,2 М), pH 3,6—5,8

Ацетат натрия · 3H₂O, м. м. = 136,09

pH при 18°С	Ацетат натрия 0,2 М, мл	Уксусная кислота 0,2 М, мл
3,6	0,75	9,25
3,8	1,20	8,80
4,0	1,80	8,20
4,2	2,65	7,35
4,4	3,70	6,30
4,6	4,90	5,10
4,8	5,90	4,10
5,0	7,00	3,00
5,2	7,90	2,10
5,4	8,60	1,40
5,6	9,10	0,90
5,8	9,40	0,60

4. Фосфатный буфер (0,05 М), pH 5,8—8,0

Однозамещенный фосфат калия, м. м. = 136,09

pH при 25°С	Однозамещенный фосфат калия 0,2 М, мл	Натриевая или калиевая щелочь 0,2 М, мл	Вода, мл
5,8	5	0,36	до 20
6,0	5	0,56	» 20
6,2	5	0,81	» 20
6,4	5	1,16	» 20
6,6	5	1,64	» 20
6,8	5	2,24	» 20
7,0	5	2,91	» 20
7,2	5	3,47	» 20
7,4	5	3,91	» 20
7,6	5	4,24	» 20
7,8	5	4,45	» 20
8,0	5	4,61	» 20

5. Трис-буфер (0,05 М), рН 7,2—9,1

Трис, м. м. = 121,14

рН		Трис 0,2 М, мл	Соляная кислота 0,1 М, мл	Вода, мл
23°C	37°C			
9,10	8,95	25	5,0	до 100
8,92	8,78	25	7,5	» 100
8,74	8,60	25	10,0	» 100
8,62	8,48	25	12,5	» 100
8,50	8,37	25	15,0	» 100
8,40	8,27	25	17,5	» 100
8,32	8,18	25	20,0	» 100
8,23	8,10	25	22,5	» 100
8,14	8,00	25	25,0	» 100
8,05	7,90	25	27,5	» 100
7,96	7,82	25	30,0	» 100
7,87	7,73	25	32,5	» 100
7,77	7,63	25	35,0	» 100
7,66	7,52	25	37,5	» 100
7,54	7,40	25	40,0	» 100
7,36	7,22	25	42,5	» 100
7,20	7,05	25	45,0	» 100

6. Боратный буфер (0,2 М),

рН 7,4—9,0

Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$),
м. м. = 381,43

Борная кислота, м. м. = 61,84

рН	Бура 0,05 М, мл	Борная кислота 0,2 М, мл
7,4	1,0	9,0
7,6	1,5	8,5
7,8	2,0	8,0
8,0	3,0	7,0
8,2	3,5	6,5
8,4	4,5	5,5
8,7	6,0	4,0
9,0	8,0	2,0

7. Боратный буфер (0,05 М),

рН 9,3—10,1

Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$),
м. м. = 381,43

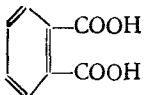
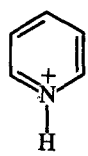
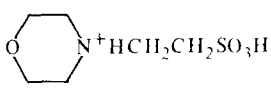
рН	Бура 0,05 М, мл	Натриевая щелочь 0,2 М, мл	Вода, мл
9,3	50	0,0	до 200
9,4	50	11,0	» 200
9,6	50	23,0	» 200
9,8	50	34,0	» 200
10,0	50	43,0	» 200
10,1	50	46,0	» 200

8. Глициновый буфер (0,05 М),

рН 8,6—10,6

Глицин, м. м. = 75,07

рН	Глицин 0,2 М, мл	Натриевая щелочь 0,2 М, мл	Вода, мл
8,6	50	4,0	до 200
8,8	50	6,0	» 200
9,0	50	8,8	» 200
9,2	50	12,0	» 200
9,4	50	16,8	» 200
9,6	50	22,4	» 200
9,8	50	27,2	» 200
10,0	50	32,0	» 200
10,4	50	38,6	» 200
10,6	50	45,5	» 200

Название	Структура кислотной формы	pK _a
Пирофосфат	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	1,52 2,36 6,00 9,25
Фосфат	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	2,12 7,21 12,36
Глицин	$\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COOH}$	2,34
Фталат		9,78 2,95 5,41
Цитрат	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	3,09 4,75 5,41
Глицил-глицин	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{CNHCH}_2\text{COOH} \end{array}$	3,06 8,13
Формиат	HCOOH	3,77
Сукцинат	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	4,19 5,48
Ацетат	CH_3COOH	4,76
Пиридин		5,14
MES		6,15

Название	Структура кислотной формы	pK _a
PIPES	$\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{—N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	6,8
Имидазол		7,05
BES	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2 = \text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	7,15
MOPS	$\text{O} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	7,20
HEPES	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{H}^+\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	7,55
Триэтаноламин (нитрило-триэтанол)	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+\text{H}$	7,77
Трис (гидроксиметил) аминометан (трис)	$(\text{HOCH}_2)_3\text{C—NH}_3^+$	8,10
Борат	H_3BO_3	9,23
Бикарбонат	HCO_3^-	10,30
Триэтиламин	$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}^+\text{H}$	10,65

Основные характеристики фосфорсодержащих органических соединений

1. Ацетилфосфат

Нестабилен в растворе, особенно в кислоте и щелочи. При комнатной температуре и pH 7,0 за 30 мин гидролизуеться на 20%, в 0,5 н. HCl — за 10 мин. на 45°. Растворы стабильны при —35° С. Гидролиз в кислоте ускоряется молибдатом (определяется как неорганический фосфат по методу Фiske—Суббароу).
2. Аргининфосфат

При 100° С в 0,1 н. HCl гидролизуеться на 100% в течение 1 мин (определяют как неорганический фосфат по методу Фiske — Суббароу). Устойчив при pH 8,0—9,0.
3. Креатинфосфат

При 100° в 0,1 н. HCl гидролизуеться на 100% в течение 1 мин, при 25° С в 0,5 н. HCl — на 50% за 4 мин. Гидролиз ускоряется молибдатом (определяется как неорганический фосфат по методу Фiske — Суббароу). При pH 7,8 гидролизуеться очень медленно. Твердые соли стабильны.
4. Гликоциаминфосфат

При 100° С в 1 н. HCl гидролизуеться на 100% за 2 мин. Более стабилен, чем креатинфосфат, к реактивам при определении по неорганическому фосфату по методу Фiske — Суббароу.
5. α — D-Глюкозо-1-фосфат (эфир Кори)

При 100° С в 1 н. HCl за 10 мин гидролизуеться на 100%. Устойчив в щелочных растворах.
6. D-Глюкозо-6-фосфат (эфир Робисона)

При 100° С в 1 н. HCl за 21,7 ч гидролизуеться на 50%, в 0,2 н. КОН при 100° С за 10 мин гидролизуеться на 65%. В 1 н. КОН при 100° С за 3 мин гидролизуеться на 60%.
7. Фруктозо-1-фосфат

При 100° С в 1 н. HCl за 30 мин гидролизуеться на 100%, за 2,8 мин — на 50%.
8. D-Фруктозо-6-фосфат (эфир Нейберга)

При 100° С в 1 н. HCl за 70 мин гидролизуеться на 50%. В 0,2 н. КОН при 100° за 10 мин гидролизуеться на 65%.
9. D-Фруктозо - 1,6 - дифосфат (эфир Гарден — Йонга)

При 100° С в 1 н. HCl за 7 мин гидролизуеться на 26,5%, за 3 ч — на 100%. В 0,2 н. NaOH при 100° С за 10 мин гидролизуеться на 65%. Сухие соли при комнатной температуре обычно стабильны, но соли бария часто разлагаются при хранении.
10. D-Глицеральдегид-3-фосфат

При 100° С в 1 н. HCl за 8 мин гидролизуеться на 50%. Неустойчив в щелочном растворе (в 1 н. NaOH гидролизуеться полностью даже при комнатной температуре).
11. D - 1,3 - Дифосфоглицериновая кислота

При 38° С и pH 7,2 за 27 мин гидролизуеться на 50%.
12. D - 2,3 - Дифосфоглицериновая кислота

Чрезвычайно устойчива к гидролизу.
13. 3-Фосфоглицериновая кислота

При 100° С в 1 н. HCl за 35,7 ч гидролизуеться на 50%, при 125° С — за 3 ч.
14. α -Глицерофосфорная кислота (l-глицерол-1-фосфат)

При 100° С в 1 н. HCl за 3 ч гидролизуеться на 2%.
15. Глицерол-2-фосфат
 β -глицерофосфорная кислота

При 100° С в 1 н. HCl очень медленно гидролизуеться. Используется в качестве буфера (pK₁ — 1,34 и pK₂ — 6,55) и как субстрат при изучении фосфомоноэстераз.
16. Фосфоенолпируват

При 100° С в 1 н. HCl за 8,3 мин гидролизуеться на 50%.

17. Рибозо-5-фосфат
При 100°С в 1 н. HCl за 2 ч гидролизует-ся на 59%.
18. D-Рибулозо-5-фосфат
При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 40 мин гидролизует-ся на 50%.
19. D-Ксилулозо-5-фосфат
При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 10 мин гидролизует-ся на 55%.
20. D-Седогептулозо-7-фосфат
При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 1 ч гидролизует-ся на 10—15%. Ва-соль обычно получается 75%-ной чистоты.
21. Гомосеринфосфат
о-фосфогомосерин)
При 100°С в 6 н. HCl за 1 ч гидролизует-ся на 12,5%, за 30 ч — на 100%.
22. Серинфосфат
(о-фосфосерин)
При 100°С в 1 н. HCl за 24 ч гидролизует-ся на 61%, в 0,5 н. NaOH — на 51%.
23. Аденозин-5'-трифосфат (АТФ)
При 100°С в 1 н. HCl за 10 мин освобождается 66% фосфата. Na-К- соли стабильны в растворе при 15°С — в течение нескольких месяцев, при 0°С — около 1 нед, при 0°С в 7%-ном растворе CCl₃ COOH — в течение нескольких часов. В щелочном растворе распадается до неорганического пирофосфата и аденозин-5'-фосфата даже при 0°С
24. Аденозин-5'-фосфат (АДФ)
При 100°С в 1 н. HCl за 10 мин освобождается терминальная фосфатная группа. Гидролиз в те-чение 60 мин дает аденин, рибозо-5-фосфат, ри-бозу и неорганический фосфат.
25. Аденозин-5'-фосфат (5' АМФ)
При 100°С в 1 н. HCl за 1 ч полностью гидро-лизует-ся до аденина, рибозо-5-фосфата, рибозы и неорганического фосфата.
26. Аденозин-3'-фосфат (3' АМФ)
При 100°С в 1 н. HCl за 1 ч полностью гидро-лизует-ся до аденина, рибозо-3-фосфата, рибозы и неорганического фосфата.
27. Аденозин-2'-фосфат (2'-АМФ)
См. аденозин-3'-фосфат.
28. Гуанозин-5-трифосфат
(ГТФ)
При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 15 мин освобождает-ся 66% общего фосфора в виде неорганического фосфата, за 1 ч полностью гидролизует-ся до гуа-нина, рибозо-5-фосфата, рибозы и неорганическо-го фосфата.
29. Гуанозин-5'-дифосфат (5'-
ГДФ)
При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 15 мин освобождает-ся 50% общего фосфора в виде неорганического фосфата; за 1 ч гидролизует-ся до гуанина, ри-бозо-5-фосфата, рибозы и неорганического фос-фата.
30. Аденозин-3', 5'-циклофосфат
(3', 5'-цАМФ)
Циклический нуклеотид более кислотостабилен, чем нециклические. При 100°С в 1 н. HCl за 30 мин из циклической АМФ освобождается 50% аденина и за 2—4 мин—аденозин-2', 3'- или 5'-фосфата. В 0,2 М Ва(OH)₂ при 100°С за 30 мин полностью гидролизует-ся с образованием смеси аденозин-3'- и аденозин-5'-фосфатов в отношении 5:1.
31. Уридин-5'-трифосфат (УТФ)
При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 15 мин освобождает-ся 66% общего фосфата в виде неорганического фосфата.
32. Уридин-5'-дифосфат (5'-УДФ)
При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 15 мин освобождает-ся 50% общего фосфора в виде неорганического фосфата.

33. Цитидин-5'-трифосфат (ЦТФ) При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 15 мин освобождается 66% общего фосфора в виде неорганического фосфата.
34. Цитидин-5'-дифосфат (ЦДФ) При 100°С в 1 н. H₂SO₄ за 15 мин освобождается 50% общего фосфора в виде неорганического фосфата.
35. Коэнзим А (КоА; КоАс Н) Хранят сухим при 0°С в эксикаторе. Очищенный препарат часто содержит некоторые примеси дисульфидов, особенно глутатиона. Растворы нестабильны выше рН 7,0, относительно стабильны при рН 2,0—6,0, хранят в замороженном состоянии.
36. Никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН, НАДН·Н⁺) Хранить сухим при 0°С в эксикаторе. Влажный препарат лабилен. Раствор медленно разлагается при 38°С и рН 7,0. Стабилен в щелочном растворе. Нагревание до 100°С в 0,1 н. NaOH в течение 10 мин не оказывает никакого воздействия.
37. Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) Стабилен в сухом виде при хранении в эксикаторе при 0°С или при комнатной температуре. Раствор стабилен при нейтральном или слабощелочном значении рН (рН 3,0—7,0) до 2 нед при 0°С. При нагревании раствор быстро разлагается. Очень лабилен в щелочных растворах. Разложение ускоряется фосфатом, малеатом и карбонатом.
38. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный (НАДФН₂, НАДФН·Н⁺, НАДФН) Хранится сухим при 0°С в эксикаторе. Стабильность растворов качественно такая же, как и для НАДН, но в кислых растворах НАДФН несколько менее стабилен, чем НАДН.
39. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) В сухом виде стабилен в эксикаторе при 0°С или при комнатной температуре. Раствор, свободный от кислот, стабилен на холоде в течение нескольких недель.
40. Никотинамид Стабилен в сухом виде при температуре ниже 50°С. В водном растворе может быть автоклавирован при 120°С в течение 20 мин, но гидролизует до никотиновой кислоты в кислых и щелочных растворах.
41. Никотиновая кислота Очень стабильна на воздухе. Сухая негигроскопична. Водные растворы стабильны к автоклавированию при 120°С в течение 20 мин. Стабильна в кислых и щелочных растворах.
42. Флавинадениндинуклеотид (ФАД) Сухой и в нейтральных водных растворах стабилен при 0°С в темноте. Холодные разведенные растворы кислот не оказывают влияния, но кипячение вызывает гидролиз до ФМН. В нейтральных растворах менее фотоллабилен, чем ФМН или рибофлавин, но в щелочном растворе очень фотоллабилен. Все растворы лучше хранить в темноте.
43. Флавинмононуклеотид (ФМН) Наиболее стабилен при рН 6,0. Нейтральные растворы стабильны при 100°С.
44. Неорганический пирофосфат При 100°С в 1 н. HCl за 10 мин гидролизует на 100%.

*Спектральные характеристики пуриновых и пиримициновых оснований
и их производных*

Наименование	pH	λ_{max} , нм	$E_{\text{max}} \times 10^{-3}$	$E_{260} \times 10^{-3}$	$E_{260} - E_{290} \times 10^{-3}$
Аденин	1—3	262,5	13,15	13,0	12,5
»	6—8	260,5	13,35	13,3	13,2
Аденозин	1—2	257	14,6	14,3	13,9
»	7—12	259,5	14,9	14,9	14,9
Аденозин-2'- или 3'-фос- фат	2	257	15,0	14,5	14,0
	7—12	259	15,3	15,3	15,2
Аденозин-5'-фосфат (АМФ)	2	257	15,0	14,5	14,0
	7—12	259	15,3	15,3	15,2
Адениндезоксирибоза-5'- фосфат	2	258	14,8	14,5	
Аденозин-5'-дифосфат (АДФ)	2	257	15,0	14,5	
	7—12	259	15,4	15,4	
Аденозин-5'-трифосфат (АТФ)	2	257	14,7	14,3	13,9
	7—11	259	15,4	15,4	15,3
Гуанин	1—2	275,5	7,35	8,0	$E_{260} - E_{290} \times 100^{-3}$
	7	275,5	8,15	7,2	6,9
	11	273,5	8,0	6,4	6,3
Гуанозин	1	256,5	12,2	11,75	5,5
	7	252,5	13,65	11,7	9,75
	11	258—266	11,3	11,3	11,4
Гуаниндезоксирибозид	1	255	12,1	11,3	11,3
	7			11,75	9,7
Гуанозин-5'-фосфат (ГМФ)	1	256	12,2	11,6	11,6
	7	252	13,7	11,7	
	11	258	11,6	11,5	
Гуанозин-5-дифосфат (ГДФ)	1	256	12,3	11,8	
	7	253	13,7	11,8	
	11	257	11,7	11,7	
Гуанозин-5'-трифосфат (ГТФ)	1	256	12,4	11,8	8,6
	7	253	13,7	11,7	11,4
	11	257	11,9	11,8	11,6
Тимин	1—7	264,5	7,89	7,4	$E_{260} - E_{290} \times 10^{-3}$
	12—13	291	5,44	3,7	6,74
Тиминдезоксирибозид (ти- мидин)	1—7	267	9,65	8,75	6,5
	12—13	267	7,38	6,65	5,4
Тимидин-5'-фосфат	1—7	267	9,9	9,0	7,1
	12			6,9	5,7
Тимидин-3'-, 5'-фосфат	1—7	267	9,9	9,0	7,1
Урацил	2—7	259,5	8,2	8,2	8,12
	14	284	6,15	4,1	
Уридин (урацилрибозид)	1—7	262	10,1	9,95	9,92
	11—12	262	7,45	7,35	7,35
Урацилдезоксирибозид	1—7	262	10,2	10,1	
	11—12	262	7,63	7,55	
Уридин-5-фосфат (УМФ)	2—7	262	10,0	9,9	9,6
	11	261	7,8	7,7	7,6
Уридин-5'-дифосфат (УДФ)	2—7	262	10,0	9,9	
	11	261	7,9	7,8	
Уридин-5'-трифосфат (УТФ)	2—7	262	10,0	9,9	9,5
	11	261	8,1	8,0	7,9

Наименование	pH	$\lambda_{\max}$, нм	$E_{\max} \times 10^{-3}$	$E_{260} \times 10^{-3}$	$E_{260} - E_{300} \times 10^{-3}$	$E_{270} - E_{300} \times 10^{-3}$
Цитозин	1—3	276	10,0	6,0	8,95	8,65
	7—10	267	6,13	5,55	3,55	6,0
Цитидин (цитозинрибозид)	1—2	280	13,4	6,4	10,5	8,0
	7—12	271	9,1	7,55	6,9	8,9
Цитозиндезоксирибозид	1—2	280	13,2	6,15	9,1	7,6
	7—12	271	9,0	7,35	7,0	8,8
Цитидин-2'-фосфат	1—2,5	278	12,75	6,9	10,4	
	6—12	270	8,89	7,75		8,8
Цитидин-3'-фосфат	1—2,5	279	13,2	6,6	10,6	
	6—12	271	9,2	7,6		9,1
Цитидин-5'-фосфат	1—2,5	280	13,2	6,3		
	6—12	271	9,1	7,4		9,0
Цитозиндезоксирибоза-5'-фосфат	1—2,5	280	13,2	6,3		
	6—12		7,4	7,2		9,0
Цитидин-5'-дифосфат (ЦДФ)	1—2,5	280	12,8	6,2		
	6—12	271	9,1	7,4		
Цитидин-5'-трифосфат (ЦТФ)	2	280	12,8	6,0	9,7	
	7—11	271	9,0	7,4	7,1	8,9

Примечание. Данные взяты из книги: Data for Biochemical Research 2 ed. Oxford at the Clarendon Press. 1976.

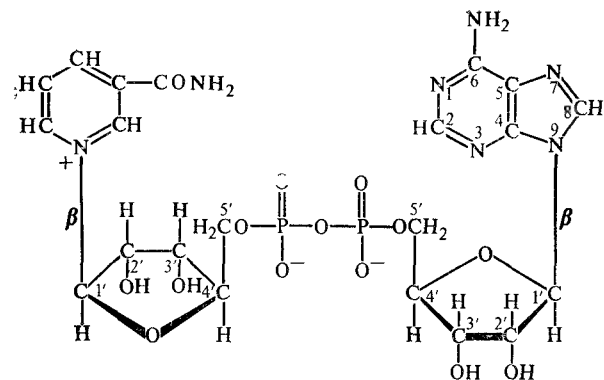
Оптические характеристики некоторых коэнзимов

Наименование	pH	$\lambda_{\max}$, нм	E	$\lambda_{\min}$, нм	E	Флуоресценция λ , нм
КоА	2,5—11,0	257	16 840			
НАДН	7,5	259	16 900	234	6 600	
	7,5	338	6 220	290	1 300	
НАДФН	7,5	259	16 900	236	7 600	
	7,5	339	6 200	290	1 400	
НАД	7,5	259	17 800	230	8 000	
НАДФ	7,5	259	18 000	231	8 100	
ФАД	7,0	263	38 000	260	37 000	530
(в 0,1 М фосфатном буфере)	7,0	375	9 300			
ФАДН ₂	7,0	450	11 300			
ФМН	7,0	450	980			
(в 0,1 М фосфатном буфере)	7,0	266	31 800			530
ФМНН ₂	7,0	373	10 400			
	7,0	445	12 500			
		450	870			

Концентрация - $5,60 \times 10^{-5} \text{ M}$ (41,0 мг/л)

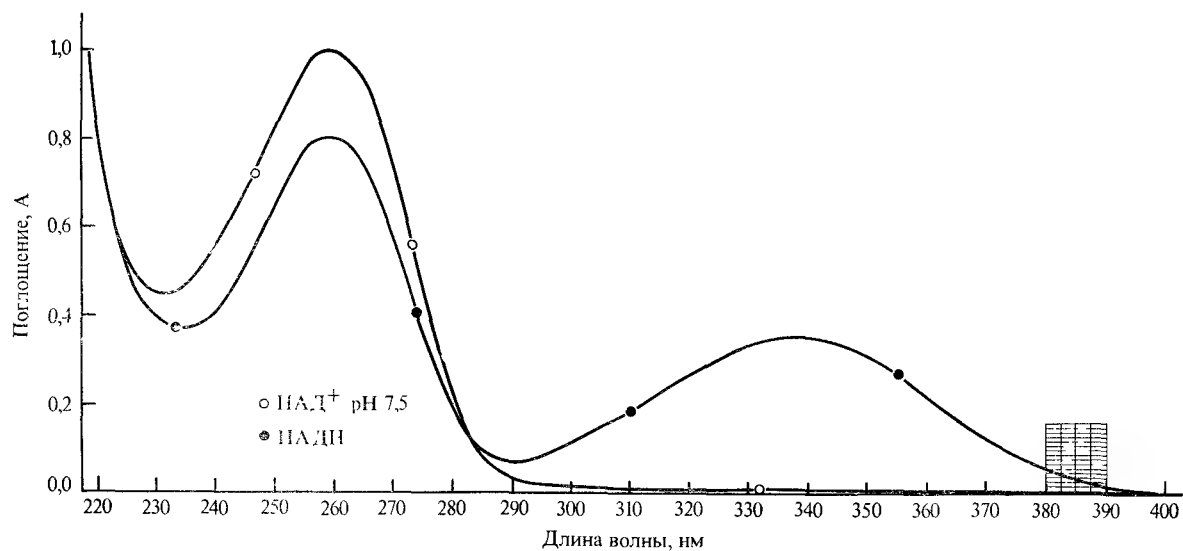
Спектрофотометрические константы

	pH	$\frac{\lambda_{\text{max}}}{\text{нм}}$	$\frac{\epsilon \cdot \text{м} \cdot 10^{-3}}{\text{нм}}$	$\frac{\lambda_{\text{min}}}{\text{нм}}$	$\frac{\epsilon \cdot \text{м} \cdot 10^{-3}}{\text{нм}}$	$\frac{A_{250}}{A_{260}}$	$\frac{A_{280}}{A_{260}}$
НАД ⁺	7,5	259	17,8	230	8,0	0,83	0,23
НАДН	9,5	259	14,4	234	6,6	0,80	0,24
		338	6,22	290	1,3		



Никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺)

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ НАД⁺ и НАДН



В таблице указаны количества сухого сульфата аммония, которые нужно добавить к 1 л раствора, чтобы получить нужное изменение концентрации сульфата аммония в процентах насыщения. Насыщенный сульфат аммония при 25°С является 4,1 М содержит 767 г соли на 1 л.

		Процент насыщения, конечная концентрация сульфата аммония																			
Процент насыщения	начальная концентрация сульфата аммония	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
		56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
	0																				
	10		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
	15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
	20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
	25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
	30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
	33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
	35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
	40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
	45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
	50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
	55												33	67	103	141	179	220	264	307	353
	60													34	69	105	143	183	227	269	314
	65														34	70	107	147	190	232	275
	70															35	72	111	153	194	237
	75																36	74	115	155	198
	80																	38	77	117	157
	85																		39	77	118
	90																			38	77
	95																				39

«Процент насыщения» в таблице означает процент от концентрации 4,1 М, принятой за 100%.

Рекомендуемые темы работ (I, III, V, VI, разделы)

1. Анализ чистоты препарата глюкозо-1-фосфата и его превращение в глюкозо-6-фосфат.
2. Выделение гликогена из печени кролика. Анализ чистоты выделенного препарата и его превращения в гликолизе. Влияние иодацетата.
3. Анализ чистоты препарата фруктозо-1,6-дифосфата. Изучение его превращения в гликолизе. Влияние фторида.
4. Анализ чистоты препарата фруктозо-1,6-дифосфата. Изучение его ферментативного расщепления. Определение константы равновесия реакции. Влияние температуры и времени инкубации.
5. Выделение и очистка транскетаказы пекарских дрожжей.
6. Выделение, очистка пируваткиназы из мышц кролика и изучение ее кинетических и регуляторных свойств.
7. Выделение гликогенфосфорилазы из скелетных мышц кролика и изучение ее кинетических и регуляторных свойств.
8. Аллостерическая регуляция фруктозо-1,6-дифосфатазы печени крысы.
9. Изучение изоферментного состава лактатдегидрогеназы сердечной и скелетной мышц крысы.
10. Исследование четвертичной структуры лактатдегидрогеназы методом ковалентной иммобилизации.
11. Изучение свойств и исследование внутриклеточной локализации изозимов аспартат аминотрансферазы печени крысы.
12. Выделение лактатдегидрогеназы из мышц кролика и изучение свойств растворимого и иммобилизованного фермента.
13. Выделение альдолазы из скелетных мышц кролика и изучение ее свойств в растворимом и иммобилизованном состоянии.
14. Выделение 3-фосфоглицераткиназы из мышц кролика и изучение образования комплекса с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой.
15. Исследование регуляторных свойств мембранных ферментов на примере Са—АТФазы саркоплазматического ретикулума.
16. Исследование полифункциональной природы глюкозо-6-фосфатазы из микросом печени крысы.
17. Влияние тенаилтрифторацетона на сукцинатоксидазную активность препарата Кейлина—Хартри.
18. Ингибирование АТФ-азной активности субмитохондриальных частиц олигомицином.
19. Окисление экзогенного НАДН митохондриями различных тканей.
20. Внешний путь окисления НАДН в митохондриях.
21. Изучение АТФ-азной активности митохондрий и субмитохондриальных частиц.
22. Отделение и реконструкция компонентов дыхательной цепи на примере коэнзима Q.
23. Изучение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для анионов.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Список сокращений	4
РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ	
Углеводы и липиды (Г. А. Соловьёва, Н. Н. Зайцева, В. И. Телепнева).	5
I. Методы концентрационного анализа	5
1. Фотометрические (спектрофотометрический и колориметрический) методы	5
2. Манометрический метод Варбурга	10
II. Количественное определение углеводов и продуктов их обмена	18
1. Определение глюкозы энзиматическим методом	18
Определение глюкозы в крови (19). Определение активности глюкозо-оксидазы (манометрический метод) (20)	
2. Определение глюкозы феррицианидным методом	21
3. Определение глюкозы и гликогена с антроном	23
4. Определение гликогена после ферментативного гидролиза глюкоамилазой из <i>Aspergillus niger</i>	25
5. Выделение гликогена из биологического материала	25
6. Методы определения молочной кислоты	26
Колориметрический метод с <i>n</i> -оксидифенилом (26). Энзиматический метод (27)	
7. Методы определения пировиноградной кислоты	29
Манометрический метод с использованием пируватдекарбоксилазы (29). Энзиматический метод с использованием лактатдегидрогеназы (31). Спектрофотометрическое определение с семикарбазидом (32)	
8. Определение неорганического фосфата	33
Метод Фiske—Суббароу (34). Метод Херса (35). Метод Самнера (35). Метод Ратбуна и Бетлах (36). Метод Бенцини (37)	
9. Определение лабильных фосфорных соединений	37
10. Определение фосфотриоз (глицеральдегид-3-фосфата и диоксиацетонфосфата)	38
11. Определение глюкозо-1-фосфата (легкогидролизуемых в кислотах фосфорных соединений)	39
12. Определение глюкозо-6-фосфата	40
Определение по фосфату (40). Энзиматический метод (40)	
13. Определение фруктозо-1,6-дифосфата	41
Определение по фруктозе (41). Анализ чистоты бариевой соли фруктозо-1,6-дифосфата (43). Перевод бариевой соли фруктозо-1,6-дифосфата в натриевую (43)	
14. Определение фруктозо-6-фосфата	44
15. Определение общего фосфора	44
16. Количественное определение фосфорных эфиров углеводов после разделения методом бумажной хроматографии	45
III. Ферментативные превращения углеводов	48
1. Анаэробный распад углеводов	49
Анаэробный распад гликогена (гликогенолиз) (50). Анаэробный распад глюкозы (гликолиз) (51). Гликолиз в присутствии йодацетата (52). Гликолиз в присутствии фторида (53). Влияние фторида на превращение фруктозо-1,6-дифосфата в молочную кислоту (54). Влияние кофакторов на превращение фруктозо-1,6-дифосфата в присутствии фторида (55). Влияние кислорода на процесс гликолиза (эффект Пастера) (56)	
2. Превращения промежуточных продуктов гликолиза	58
Превращение глюкозо-1-фосфата в гликоген (58). Влияние адреналина на уровень сахара крови и активность фосфорилазы мышечной ткани (59). Превращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат (60). Превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат (61). Превращение фруктозо-6-фосфата в глюкозо-6-фосфат (63). Образование фосфотриоз из фруктозо-1,6-дифосфата (63)	

3. Фосфатазное расщепление гексозофосфатов	65
Превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозу (65). Превращение фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат (66)	
IV. Методы выделения, фракционирования и количественного определения липидов	67
1. Основные приемы работы с липидами	67
2. Определение общего содержания липидов в тканях	70
3. Определение липидов мозговой ткани с помощью хроматографии в тонком слое	71
4. Выделение триацилглицеринов из печени крысы	75
5. Выделение фосфолипидов из яичных желтков	76
 РАЗДЕЛ ВТОРОЙ	
Природные азотсодержащие соединения	79
 (М. И. Сафронова, Н. Б. Гусев, Л. Н. Матвеева, М. М. Фейгина)	
A. Белки	80
I. Методы количественного определения белка в биологическом материале	80
1. Колориметрические методы	80
Биуретовый метод (80). Метод Лоури (81). Определение белка в присутствии неионных детергентов (82). Определение с кумасси синим (83)	
2. Спектрофотометрический метод	83
3. Определение содержания белка в препаратах, иммобилизованных на сефарозе	84
Спектрофотометрическое определение в присутствии полиэтиленгликоля (84). Колориметрическое определение по модифицированному методу Брэдфорд (85)	
4. Определение по азоту	85
Изотермическая перегонка аммиака (метод Конвея) (85). Микрометод определения азота в биологическом материале (по Енике) (87)	
II. Методы фракционирования белков	88
1. Электрофоретическое разделение белков	88
Электрофорез на бумаге (89). Электрофорез в агаровом геле (92). Электрофорез в полиакриламидном геле (94). Аналитическое изoeлек-трическое фокусирование белков в полиакриламидном геле (98)	
2. Разделение белков методом хроматографии	101
Метод гель-хроматографии (106). Метод ионообменной хроматографии (108). Метод адсорбционной хроматографии (114)	
III. Определение молекулярной массы белков	116
1. Метод гель-хроматографии на колонках	116
2. Гель-хроматография в тонком слое сефадекса	117
3. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия	119
Метод Вебера и Осборн (119). Метод Лэмли (121)	
IV. Определение аминокислотного состава белков и пептидов	122
1. Гидролиз белков и пептидов	123
Кислотный гидролиз (124). Щелочной гидролиз (125)	
2. Разделение и идентификация аминокислот	125
Метод хроматографии на бумаге (126). Метод ионообменной хроматографии (132). Метод средневольтного горизонтального электрофореза на бумаге (137)	
V. Гидролиз белков до пептидов	139
1. Ферментативный гидролиз	140
Расщепление трипсином (140). Расщепление химотрипсином (140)	
2. Химический гидролиз	141
Расщепление по остаткам метионина (141). Расщепление по остаткам цистеина (142). Расщепление по остаткам триптофана (144)	
VI. Определение функциональных групп в белках и пептидах	145
1. Свободные NH ₂ -группы белков и пептидов	145
Определение N-концевых аминокислот методом динитрофенилирования (145). Определение количества свободных NH ₂ -групп в пептидах (аминокислотах) методом частичного динитрофенилирования (147). Определение N-концевых аминокислот дансильным методом (148).	
2. C-концевые аминокислоты в белках и пептидах	154
Определение C-концевых аминокислот с помощью карбоксипептидаз	

(155). Определение С-концевых аминокислот с помощью гидразинолиза (156)	
3. Сульфгидрильные группы белков и пептидов	157
Определение числа сульфгидрильных групп методом титрования <i>п</i> -хлор-меркурибензоатом (158). Определение числа сульфгидрильных групп с помощью реактива Элмана (160)	
Б. Нуклеиновые кислоты	
I. Количественное определение нуклеиновых кислот в биологическом материале	161
1. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот	162
2. Определение нуклеиновых кислот по фосфору	163
3. Определение нуклеиновых кислот по пентозе	163
Определение содержания ДНК с дифениламиноом по Дише (163). Определение содержания РНК с орцином по Мейбаум (164)	
4. Раздельное определение РНК и ДНК в тканях (по методу Шмидта—Таннгаузера)	164
II. Выделение нуклеиновых кислот	166
1. Выделение и очистка ДНК по методу Мармура	166
2. Выделение препаратов ДНК и РНК фенольным методом (по Кирби—Георгиеву)	167
3. Выделение препарата РНК из печени крысы фенольным методом (по Шерреру)	169
4. Выделение РНК из рибосом	170
III. Методы фракционирования нуклеиновых кислот	171
1. Адсорбционная хроматография нуклеиновых кислот на гидроксипатите	171
2. Ультрацентрифугирование рибонуклеиновых кислот в градиенте плотности сахарозы	172
3. Электрофорез рибонуклеиновых кислот в полиакриламидном геле	173
Разделение суммарной фракции РНК (173). Разделение рибосомальной РНК (174)	
IV. Ферментативное расщепление нуклеиновых кислот	175
1. Получение рестриктов ДНК фага λ и разделение их с помощью электрофореза в геле агарозы	175
2. Расщепление РНК панкреатической рибонуклеазой и разделение продуктов хроматографическими методами	176
Гель-хроматография на колонке с сефадексом (176). Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (177)	
V. Определение нуклеотидного состава нуклеиновых кислот	177
1. Нуклеотидный состав ДНК	177
Разделение оснований ДНК методом хроматографии на бумаге (178)	
Разделение оснований ДНК методом тонкослойной хроматографии (179)	
2. Нуклеотидный состав РНК	180
Разделение рибомононуклеотидов методом электрофореза на бумаге (180). Разделение рибомононуклеотидов методом хроматографии на бумаге (181). Разделение рибомононуклеотидов методом тонкослойной хроматографии (182)	
В. Низкомолекулярные азотсодержащие соединения	
I. Определение аденинсодержащих нуклеотидов в животных тканях	183
1. Разделение адениловых нуклеотидов	183
Метод электрофореза на бумаге (183). Метод хроматографии на бумаге (184). Метод тонкослойной хроматографии (184). Метод ионообменной хроматографии на колонке (186)	
2. Количественное определение компонентов адениловой системы	187
II. Определение содержания никотинамидных коферментов в животных тканях	187
1. Определение НАД ⁺ и НАДФ ⁺	188
2. Определение НАДН и НАДФН	189
III. Определение креатина и фосфокреатина	188
1. Определение креатина с диацетилом	189
2. Определение фосфокреатина по фосфору	190
IV. Определение гистидинсодержащих дипептидов	191
1. Определение карнозина в безбелковом экстракте по диазореакции	192
2. Определение дипептидов с помощью хроматографии на бумаге	192

3. Определение дипептидов с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол»	193
V. Определение свободных аминокислот	194
1. Определение свободных аминокислот в мышечной ткани	195
2. Определение свободных аминокислот в сыворотке крови	195

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ

Энзимология	196
-------------	-----

(П. Л. Вульфсон, Н. К. Наградова, Г. А. Кочетов, В. И. Муронец)

I. Общие принципы работы с ферментами	196
1. Экстракция, методы очистки и определение чистоты ферментных препаратов	198
2. Хранение ферментов	205
3. Выражение активности ферментов	206
II. Исследование каталитических свойств ферментов	206
1. Определение кинетических параметров	206
2. Методы определения ферментативной активности	208
3. Определение активности в системе сопряженных реакций	208
4. Определение зависимости скорости реакции от концентрации субстрата	210
5. Определение зависимости скорости реакции от pH	211
6. Определение зависимости скорости реакции от температуры	211
7. Исследование влияния ингибиторов	212
8. Исследование стабильности ферментов	214
9. Исследование аллостерических ферментов	214
III. Выделение, очистка и определение активности ферментов	216
1. Гексокиназа	216
2. Гликогенфосфорилаза	219
3. Киназа фосфорилазы	222
4. Получение фосфорилазы α	225
5. Фосфоглюкомутаза	226
6. Глюкозофосфатизомераза	232
7. Фосфофруктокиназа	237
8. Альдолаза	245
9. Триозофосфатизомераза	249
10. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	253
11. Получение триозофосфатов	258
12. 3-Фосфоглицераткиназа	260
13. Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	266
14. Пируваткиназа	269
15. Лактатдегидрогеназа	273
16. Алкогольдегидрогеназа	276
17. Транскетолаза	279
Транскетолаза из пекарских дрожжей (279). Транскетолаза из печени свиньи (285)	
18. Получение фосфопентоз	287
19. Получение ферментного препарата, содержащего триозофосфатизомеразу и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу, из скелетных мышц кролика	290
20. Креатинкиназа	291
IV. Имобилизация ферментов на BgCN-сефарозе	296
1. Получение препарата BgCN-активированной сефарозы	296
2. Имобилизация ферментов	297
3. Определение активности иммобилизованных ферментов	298
4. Получение иммобилизованных субъединиц олигомерных ферментов	300
5. Имобилизация фосфоглицераткиназы и ее использование для синтеза 1,3-дифосфоглицерата	303
6. Получение иммуносорбентов и их использование для очистки антител	304

РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ

Иммуноферментный анализ

(Т. В. Буларгина)

I. Получение антител	307
1. Получение поликлональных антител	307
2. Получение моноклональных антител	309
II. Получение конъюгатов антител с ферментными метками	317

1. Получение конъюгатов антител с пероксидазой	317
2. Получение конъюгатов антител с щелочной фосфатазой	318
3. Определение рабочего титра конъюгатов иммуноглобулинов с ферментной меткой	318
III. Изучение свойств антител	320
1. Определение специфичности гибридом	320
2. Определение титров антител в асцитных жидкостях	321
3. Определение классов и подклассов иммуноглобулинов	321
4. Определение эпитопной специфичности антител	322
5. Определение аффинности антител	323
IV. Изучение антигенной структуры ферментов	325
1. Очистка антигенов на иммуносорбенте с моноклональными антителами	325
2. Сравнение антигенных структур изоферментов и ферментов из разных источников	325

РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ

Регуляция активности ферментов

(Н. Ю. Гончарова, М. В. Иванов, Е. В. Петушкова, А. М. Рубцов)

I. Регуляция активности ферментов клеточными метаболитами	330
1. Изучение свойств цАМФ-зависимых протеинкиназ	330
2. Регуляция активности пируваткиназы скелетных мышц	333
3. Изучение изоферментного состава лактатдегидрогеназы сердечной и скелетной мышц	336
4. Изучение конформационных изменений лактатдегидрогеназы при связывании кофермента и субстрата	340
5. Исследование внутриклеточной локализации изотимов аспартатами-нотрансферазы печени	351
6. Аллостерическая регуляция активности фруктозо-1,6-дифосфатазы	354
II. Регуляция активности мембраносвязанных ферментов	358
1. Исследование регуляторных свойств Са—АТФазы саркоплазматического ретикулула	358
2. Изучение процессов активации аденилатциклазы	368
3. Модуляция активности глюкозо-6-фосфатазы под действием детергентов	370
4. Изменение свойств гексокиназы при связывании с мембранами	373
III. Роль белок-белковых взаимодействий в реализации каталитической активности ферментов	377
1. Регуляция активности фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов	377
2. Иммунизация глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы	383
3. Иммунизация лактатдегидрогеназы	386
4. Иммунизация альдолазы и получение комплекса альдолазы с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой	389
IV. Подходы к выявлению функционально значимых участков и групп молекулы фермента	391
1. Получение протеолитических фрагментов миозина, обладающих АТФазной активностью	391
2. Роль сульфгидрильных групп и гидрофобных взаимодействий в АТФазной активности миозина	398

РАЗДЕЛ ШЕСТОЙ

Метаболизм митохондрий. Биоэнергетика

(А. Д. Виноградов, Ю. Н. Лейкин, Е. А. Васильева, В. Г. Гривенникова, А. Б. Котляр, Т. Ю. Липская)

I. Получение интактных митохондрий из различных тканей	403
1. Выделение митохондрий скелетных мышц	404
2. Выделение митохондрий сердечной мышцы	405
3. Выделение митохондрий печени крысы	406
II. Получение субмитохондриальных фрагментов и фракционирование митохондрий	407
1. Получение субмитохондриальных фрагментов (препарат Кейлина—Хартри)	407
2. Получение субмитохондриальных частиц из сердца быка	408
3. Фракционирование интактных митохондрий печени крысы	410
III. Получение отдельных компонентов дыхательной цепи и реконструкция полиферментных систем	414

1. Отделение и реконструкция компонентов дыхательной цепи (сукцинат-дегидрогеназа)	415
2. Отделение и реконструкция компонентов дыхательной цепи (цитохром c)	418
3. Отделение и реконструкция компонентов дыхательной цепи (на примере коэнзима Q)	421
4. Получение сукцинат : убихинон-оксидоредуктазы (комплекс II)	423
5. Получение сукцинат : цитохром c-оксидоредуктазы (комплекс II+III)	426
6. Получение убихинон : цитохром c-оксидоредуктазы (комплекс III)	429
7. Получение цитохромоксидазы (комплекс IV)	432
IV. Функционирование дыхательной цепи	435
1. Дыхательная цепь. Ингибиторы переноса электронов	435
2. Окисление НАДН в митохондриях различных тканей	436
3. Функционирование первого пункта сопряжения в интактных митохондриях	438
4. Ингибирование НАДН-оксидазной активности дыхательной цепи роте- ноном	441
V. Проницаемость мембран и транслоказные реакции в митохондриях	442
1. Перенос ионов калия через митохондриальную мембрану	442
2. Изучение проницаемости митохондриальной мембраны для растворов электролитов	444
3. Пассивная проницаемость внутренней мембраны митохондрий для анионов	447
4. Активный транспорт ионов Ca^{2+} в митохондриях печени	449
5. Полярграфическое изучение активного транспорта кальция в митохонд- риях печени	450
6. Специфичность системы транспорта кальция в митохондриях	453
7. Накопление ионов Mg^{2+} митохондриями сердечной мышцы	455
8. Изучение кинетики транспорта неорганического фосфата в митохондриях	458
9. Роль транслоказных реакций в кинетике синтеза и гидролиза АТФ в митохондриях	459
10. Роль транслоказных реакций в функционировании ЦТК	460
VI. Реакции трансформации энергии в митохондриях	462
1. Полярграфическое определение степени сопряженности препарата ми- тохондрий	462
2. Измерение степени сопряженности и скорости окислительного фосфорили- рования в митохондриях. Зависимость от концентрации белка и роль ионов Ca^{2+}	465
3. Окислительное фосфорилирование с различными субстратами	467
4. Влияние разобщителей на процессы трансформации энергии в митохонд- риях	469
5. Измерение АТФазной активности митохондрий	471
6. Изучение АТФазной реакции, катализируемой АТФ-синтетазным комплек- сом митохондрий	474
7. Влияние внутримитохондриального Ca^{2+} на реакции синтеза и гидролиза АТФ в митохондриях	476
8. Креатинкиназная активность митохондрий сердечной мышцы	479
VII. Некоторые методы, применяемые при изучении метаболизма митохондрий	480
1. Полярграфический метод определения поглощения кислорода	480
2. Определение белка митохондрий и субмитохондриальных частиц с биуре- товым реактивом	483
3. Определение концентрации растворов магния и кальция методом комп- лексонометрического титрования	484
Приложение	487